



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STUDIUM VÝSKYTU KOLISTINU V PŮDĚ

STUDY OF THE OCCURRENCE OF COLISTIN IN SOIL

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Aneta Veldamonová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1532/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studentka: **Bc. Aneta Veldamonová**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium výskytu kolistinu v půdě

Zadání diplomové práce:

1. Zpracovat literární rešerši.
2. Optimalizovat extrakční a analytickou metodu pro stanovení kolistinu v půdě.
3. Analyzovat sadu reálných vzorků půdy.
4. Zhodnotit získané výsledky.

Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Aneta Veldamonová
student(ka)

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Kolistin je polypeptidové antibiotikum „poslední záchrany“ účinné proti gramnegativním bakteriím. Zvyšování jeho spotřeby ve veterinárním lékařství v posledních 30 letech však vedlo k rozvoji rezistence bakterií i vůči kolistinu. Aplikace kejdy do půdy obsahující nemetabolizovaný kolistin a rezistentní bakterie představuje riziko, protože může docházet k dalšímu rozvoji rezistence bakterií vůči kolistinu a jejímu šíření do dalších složek životního prostředí. Proto byla tato práce zaměřena na vytvoření a optimalizaci extrakční a analytické metody pro půdní vzorky obsahující kolistin. Kolistin byl detekován pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC /MS a UPLC/MS/MS). Přestože bylo testováno mnoho extrakčních roztoků ve spojení s ultrazvukovou extrakcí a přečištěním na různých kolonkách SPE, kolistin se nepodařilo úspěšně z půdy vyextrahovat. Kolistin byl úspěšně detekován pouze v extraktu z kejdy. Důvodem, proč kolistin v extraktech z půdy nebyl detekován, mohla být sorpce kolistinu na půdní organickou hmotu nebo tvorba komplexů kolistinu s huminovými látkami.

ABSTRACT

Colistin is a polypeptide antibiotic used as a "last resort" effective against Gram-negative bacteria. However, increase in its consumption in veterinary medicine in the last 30 years has led to the development of bacterial resistance even to colistin. The application of slurry to soil containing unmetabolized colistin and resistant bacteria poses a risk, because the resistance of bacteria to colistin can be further developed and spread to other components of the environment. Therefore, this work was focused on the creation and optimization of extraction and analytical methods for soil samples containing colistin. Colistin was detected by liquid chromatography in connection with mass spectrometry (HPLC/MS and UPLC/MS/MS). Many extraction solutions have been tested in connection with ultrasonic extraction and purification on various SPE columns, yet colistin has not been successfully extracted from the soil. Colistin was successfully detected only in the slurry extract. The reason why colistin was not detected in soil extracts could be the sorption of colistin on soil organic matter or the formation of complexes of colistin with humic substances.

KLÍČOVÁ SLOVA

kolistin, kontaminace životního prostředí, rezistence bakterií, extrakce, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

KEY WORDS

colistin, environmental contaminant, bacterial resistance, extraction, liquid chromatography, mass spectrometry

VELDAMONOVÁ, Aneta. *Studium výskytu kolistinu v půdě*. Brno, 2021. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Ludmila Mravcová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování:

Velké poděkování patří mé vedoucí diplomové práce Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a dodávání optimismu během experimentální práce v laboratoři. Ráda bych také poděkovala své rodině a partnerovi za podporu během celého studia.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Kolistin.....	8
2.1.1	Struktura.....	8
2.1.2	Dostupné formy	9
2.1.3	Spektrum účinnosti.....	10
2.1.4	Mechanismy účinku	10
2.2	Rezistence	12
2.2.1	Mechanismus rezistence bakterií ke kolistin.....	13
2.3	Veterinární lékařství.....	17
2.3.1	Ekotoxicita kolistinu	18
2.4	Analýza kolistinu	20
2.4.1	Příprava vzorků obsahující kolistin.....	20
2.4.2	Kvantitativní stanovení kolistinu	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	Použité chemikálie	26
3.2	Použité standardy	26
3.3	Analyzovaná matrice.....	26
3.4	Použité přístroje a pomůcky.....	26
3.5	Odběr vzorků půdy.....	27
3.6	První část.....	27
3.6.1	Optimalizace HPLC/MS	27
3.6.2	Optimalizace extrakce a zakoncentrování kolistinu.....	28
3.7	Druhá část	31
3.7.1	Optimalizace UPLC/MS/MS	31
3.7.2	Optimalizace extrakce a zakoncentrování kolistinu.....	32
3.7.3	Matriční efekt	32
3.7.4	Optimalizace extrakčního rozpouštědla	32
3.7.5	Experiment s prasečí kejdou	33
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
4.1	První část.....	35
4.1.1	Optimalizace HPLC/MS	35

4.1.2	Optimalizace extrakce a zakoncentrování kolistinu.....	36
4.2	Druhá část	37
4.2.1	Optimalizace UPLC/MS/MS	37
4.2.2	Optimalizace extrakce a zakoncentrování kolistinu.....	39
4.2.3	Optimalizace extrakčního roztoku	41
4.2.4	Experiment s prasečí kejdou	42
4.2.5	Carry-over efekt	43
5	ZÁVĚR.....	45
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	52
8	PŘÍLOHY.....	53
8.1	Extrakce	53

1 ÚVOD

Kolistin neboli polymyxin E je polykationtové antibiotikum, které vykazuje baktericidní účinky proti gramnegativním bakteriím, jako jsou např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a *Klebsiella* spp. Nedlouho po jeho uvedení na trh, byly zaznamenávány nežádoucí účinky u pacientů (nefrotoxicita, ototoxická a neurotoxicita) a od jeho podávání se takřka upustilo. Kolistin se tak podával jen v případě nouze, kdy běžně podávaná antibiotika nebyla již účinná (tzv. antibiotikum poslední záchrany). Nicméně kvůli nadměrnému podávání jiných antibiotik nejen v humánní medicíně, ale také ve veterinární medicíně došlo k rozvoji rezistence a multirezistence bakterií k těmto antibiotikům. Neúčinnost těchto běžně používaných antibiotik tak vedla v 90. letech minulého století k opětovnému zavedení kolistinu do běžné zdravotnické praxe, jak humánní, tak i veterinární. Bohužel i u kolistinu došlo v dalších letech vlivem nadměrného podávání k rozvoji rezistence bakterií a velkému zdravotnímu riziku nejen pro společnost, ale také ke kontaminaci životního prostředí.

Rezistence bakterií ke kolistinu byla dlouhou dobu spojována pouze s chromosomálními mutacemi, a jejich přenášením na dceřiné buňky. V roce 2015 byla nicméně publikována první studie [21], ve které byl popsán horizontální přenos plazmidových genů způsobující rezistenci vůči kolistinu. Po ní byly v následujících letech objeveny i další plazmidové geny a zaznamenáno rozšíření rezistentních bakterií ke kolistinu po celém světě. Do té doby se kolistin stanovoval především v biologických tekutinách a tkáních. Po objevení plazmidy zprostředkované rezistence se ale začali publikovat více i studie zabývající se jeho detekcí v krmivech pro zemědělský dobytek a v hnojích či kejďě, která se často aplikuje na půdy [37, 38, 40, 48]. Bohužel doposud nebyla vytvořena extrakční a analytická metoda zabývající se stanovením kolistinu v půdě. To představuje značný problém, jelikož tak není možné sledovat jeho chování v půdě po aplikaci kontaminovaných organických hnojiv.

2 TEORETICKÁ ČÁST

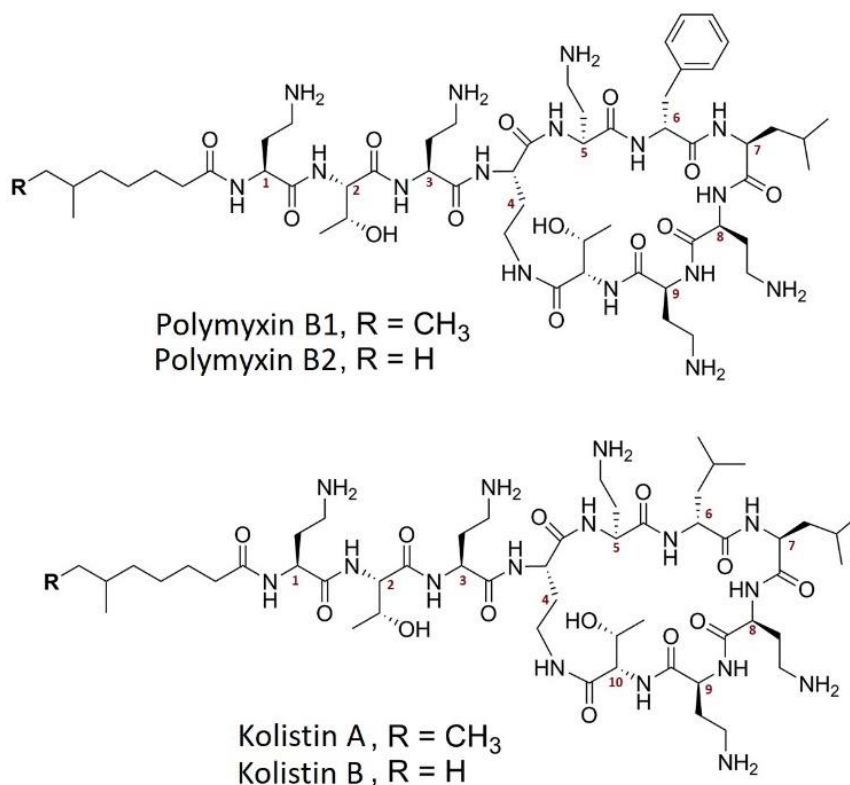
2.1 Kolistin

Kolistin neboli polymyxin E patří do skupiny polypeptidových antibiotik, přesněji do skupiny polymyxinů. Tato skupina, tvořená pěti polymyxiny (A–E), byla objevena v roce 1947. Jednotlivé typy polymyxinů se liší v aminokyselinovém složení a navázanou mastnou kyselinou. Klinicky využívané jsou polymyxiny B a E, mezi nimiž je rozdíl pouze v jedné aminokyselině. Polymyxin B obsahuje v poloze 6 fenylalanin, zatímco polymyxin E obsahuje D-leucin [1].

Kolistin je bílý nebo téměř bílý prášek. Jde o polární látku, která je vysoce rozpustná ve vodě (564 g/l) a nerozpustná v organických rozpouštědlech (např. aceton, 96% ethanol) [4]. Má také vysokou hodnotu pKa (12,1 při 25 °C). Jde tedy o velmi slabou kyselinu. Hodnota logP (–3,3) kolistinu také naznačuje jeho hydrofilní charakter [54].

2.1.1 Struktura

Kolistin je směs polymyxinů E1, E2, E3, E1-I a E1-7MOA [2]. Všechny polymyxiny E jsou složeny z cyklického heptapeptidu a tripeptidového postranního řetězce, na jehož N-konci je navázána mastná kyselina. Podle navázané mastné kyseliny se rozlišuje mezi jednotlivými typy kolistinů. V kolistinu A je navázána kyselina 6-methyloktanová, zatímco u kolistinu B 6-methylheptanová jak vidět na obr 1. Cyklický heptapeptid je složen z čtyř L- α,γ -diaminomásečných kyselin, dvou D-leucinů a jednoho L-threoninu. Tripeptid je tvořen dvěma L- α,γ -diaminomásečnými kyselinami a L-threoninem [1]. Rozdíly v mastných kyselinách a aminokyselinách v jednotlivých typech kolistinu jsou pro přehled uvedeny v tab 1.



Obr 1: Chemická struktura kolistinu a polymyxinu B [3]

Tab 1: Rozdíly v jednotlivých typech kolistinů [4]

Kolistin	Aminokyselina v pozici 6	Mastná kyselina	Sumární vzorec	Molární hmotnost (g/mol)
E1	D-Leu	6-methyloktanová	$C_{53}H_{100}N_{16}O_{13}$	1170
E2	D-Leu	6-methylheptanová	$C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$	1155
E3	D-Leu	oktanová	$C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$	1155
E1-I	D-ILe	6-methyloktanová	$C_{53}H_{100}N_{16}O_{13}$	1170
E1-7MOA	D-Leu	7-methyloktanová	$C_{53}H_{100}N_{16}O_{13}$	1170

Dostupné přípravky kolistinu obsahují především kolistin A (polymyxin E1) a kolistin B (polymyxin E2). V Českém lékopise [4] jsou stanoveny procentuální limity (pro vysušenou směs) jednotlivých typů kolistinu v podávaných přípravcích:

- polymyxin E1-I: nejvýše 10,0 %
polymyxin E1-7MOA: nejvýše 10,0 %
- polymyxin E3: nejvýše 10,0 %
- polymyxin E1, E2, E3, E1-I a E1-7MOA (součet obsahů): nejméně 77,0 %.

Důležitými chemickými strukturami v kolistinu, které umožňují jeho interakci s membránami gramnegativních bakterií a tím jeho baktericidní aktivitu jsou:

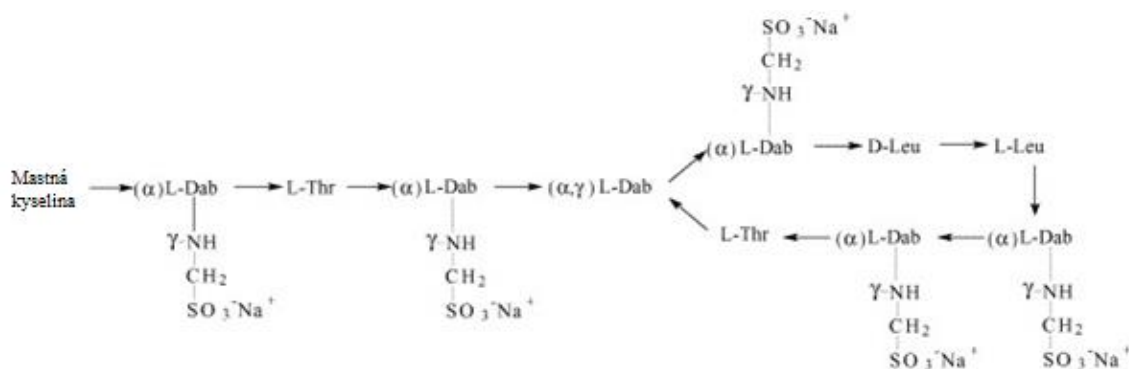
- mastná kyselina představující hydrofobní část kolistinu,
- možné pozitivní náboje na postranních řetězcích aminokyseliny L- α,γ -diaminomáselné (polohy 1, 3, 5, 8, 9),
- farmakofor (vazba mezi mastnou kyselinou a tripeptidem, a pozice 6 a 7 na heptapeptidovém cyklu),
- aminokyseliny v pozicích 2–5 a 8–10 (donory vodíků),
- heptapeptidový kruh představující polární část kolistinu [5].

2.1.2 Dostupné formy

Kolistin je komerčně dostupný ve dvou formách, buď jako kolistin sulfát (CS) anebo jako sodná sůl kolistimethátu (CMS) [4]. Kolistin (označení používané obecně pro kolistin sulfát) je polykationt, kdežto kolistimethát (označení používané pro sodnou sůl kolistimethátu) je polyaniont v širokém rozsahu pH [6].

Kolistin sulfát je směs síranů polymyxinů E, které jsou produkovány bakteriemi *Bacillus polymyxy*. Ve formě tablet nebo sirupu se kolistin sulfát podává např. při tzv. selektivní dekontaminaci trávicího traktu, která má za cíl snížit množství bakterií a případně tak předejít sekundárním infekcím dýchacího ústrojí. Pro léčení kožních infekcí je kolistin sulfát dostupný ve formě topického přípravku [6].

Sodná sůl kolistimethátu (obr 2) je semisyntetický přípravek, který se připravuje reakcí kolistinu, formaldehydu a hydrogensířičitanu sodného [4]. CMS je mikrobiologicky neaktivní proléčivo, které se až po podání v těle metabolizuje na kolistin vykazující antimikrobiální aktivitu. CMS se může podávat intravenózně, intramuskulárně, topicky prostřednictvím aerosolu (nebulizací) nebo inhalací. Inhalační podání se používá často při léčbě plicní infekce způsobené bakterií *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrózou [6, 7].



Obr 2: Chemická struktura sodné soli kolistimethátu [8]

2.1.3 Spektrum účinnosti

Kolistin vykazuje baktericidní aktivitu proti většině gramnegativním aerobním bacilům, jako např. *Acinetobacter* spp, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia pseudotuberculosis*, *Morganella morganii*, *Haemophilus influenzae* a *Stenotrophomonas maltophilia* [9]. Dále je kolistin účinný proti několika druhům mykobakterií, např. *Mycobacterium xenopi*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. phlei* and *M. smegmatis* [10].

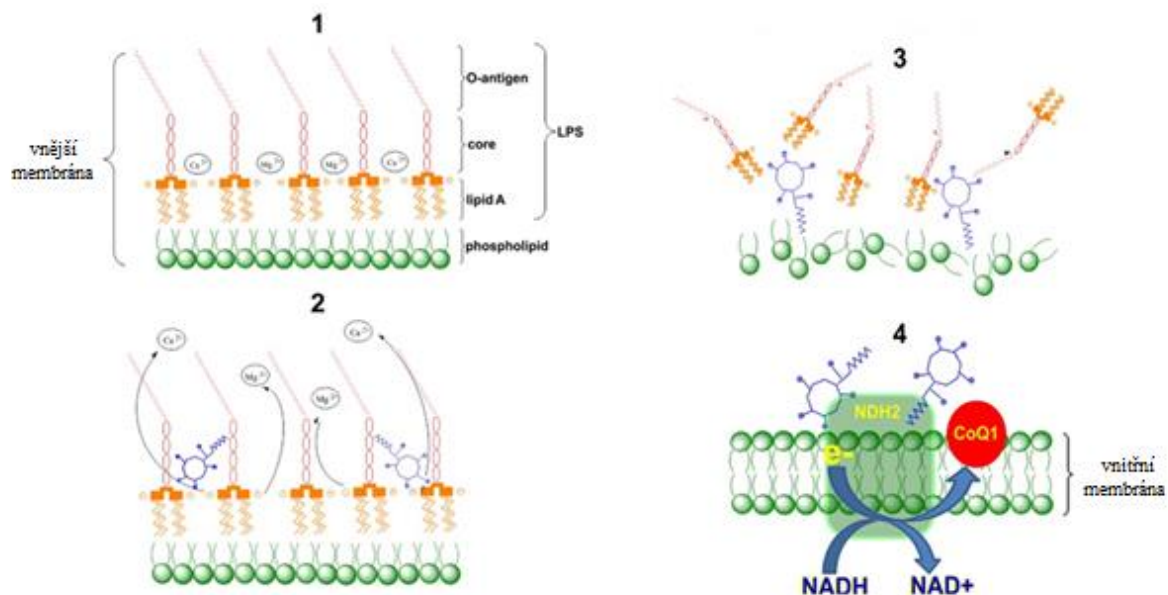
Některé druhy jsou naopak přirozeně rezistentní vůči kolistinu. Jedná se např. o *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Proteu* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp., *Edwardsiella* spp., a *Brucella* spp. Obecně lze konstatovat, že kolistin není účinný proti gramnegativním a grampozitivním aerobním kokům, grampozitivním aerobním bacilům, všem anaerobům, houbám a parazitům [9].

2.1.4 Mechanismy účinku

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, kolistin vykazuje antibakteriální aktivitu proti gramnegativním bakteriím. Tyto bakterie mají nejen cytoplazmatickou membránu, ale také vnější membránu, která je chrání před vnějším prostředím a škodlivými látkami. Vnější membrána obsahuje specifické struktury, se kterými interagují molekuly kolistinu a na těchto interakci je pak založen primární způsob baktericidního účinku kolistinu. Kolistin se váže ve vnější membráně na lipopolysacharidy (LPS), konkrétně na lipidy A. Navázání je uskutečněno díky elektrostatické interakci mezi kladně nabitými zbytky aminokyseliny L- α,γ -diaminomásečné v kolistinu a záporně nabitými fosfátovými skupinami lipidu A v LPS. Dále kolistin může kompetitivně vytěšňovat vápenaté a hořečnaté kationy stabilizující lipopolysacharidy, a v důsledku toho může docházet ke změně jejich trojrozměrné struktury. Hydrofobní mastný řetězec a aminokyseliny v pozici 6 (D-Leu) a pozici 7 (L-Leu) v molekule kolistinu pak umožní jeho inzerci do vnější membrány bakterie. Souhrou všech těchto procesů dochází k destabilizaci vnější membrány a kolistin prostupuje k fosfolipidové vnitřní membráně [11].

Jsou popsány dva základní způsoby, kterými kolistin může interagovat s vnitřní fosfolipidovou membránou bakterie. První způsob zahrnuje narušení integrity membrány mastnou kyselinou a hydrofilní částí kolistinu, což vede k úniku intracelulárního obsahu

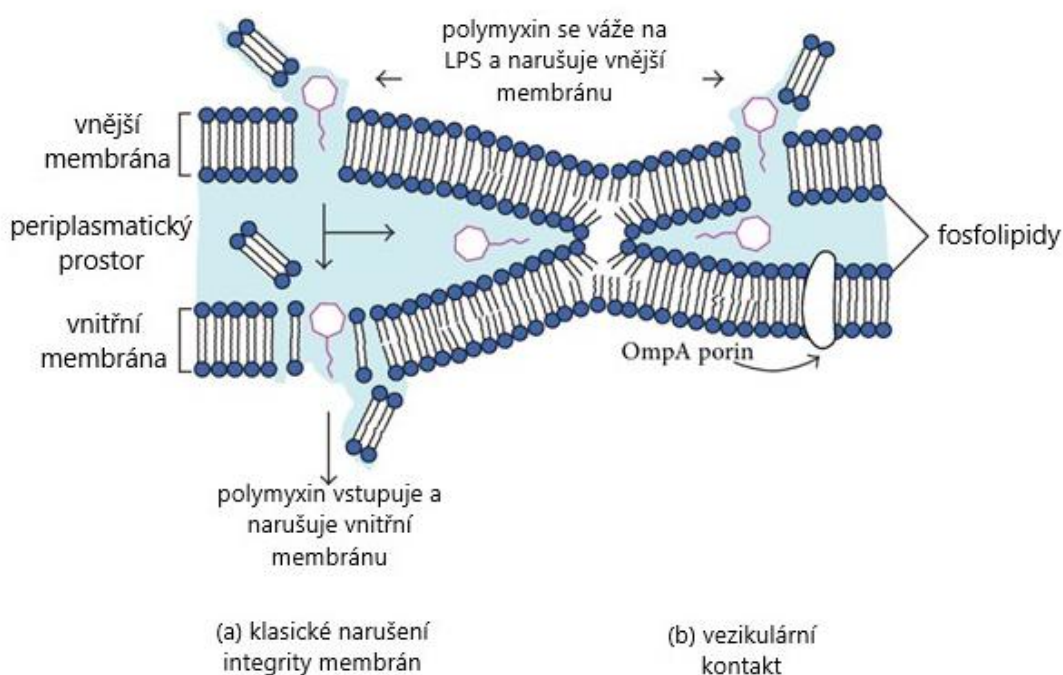
a následně k buněčné smrti [11]. Druhým způsobem je inhibice respiračního enzymu NDH-2, který katalyzuje přenos elektronů na vnitřní membráně [12]. Základní antimikrobiální mechanismus lýze buňky s inhibicí NDH-2 je zobrazen na obr 3.



Obr 3: Mechanismus baktericidního účinku kolistinu zahrnující inhibici NDH-2 (1. Vnější membrána gramnegativní bakterie; 2. Interakce kolistinu s vnější membránou; 3. Destabilizace vnější membrány; 4 Inhibice NDH-2 na vnitřní membráně) [12]

Dalším mechanismem antimikrobiální aktivity kolistinu, která se může uplatňovat, je inhibice endotoxinové aktivity. Endotoxiny jsou lipopolysacharidy, které se uvolňují do okolí bakterií až po zániku jejich buněčné stěny a iniciují zánětlivou odpověď napadeného organismu. Navázáním kolistinu na lipid A v LPS se endotoxinová aktivita inhibuje a nedojde tak uvolnění endotoxinů [9].

U polymyxinu B byl popsán mechanismus tzv. vezikulárního kontaktu. Vzhledem k téměř stejné struktuře kolistinu a polymyxinu B se tak předpokládá i stejný mechanismus účinku u kolistinu. Pomocí elektrostatických interakcí a hydrofobních domén může molekula polymyxinu vstoupit do periplazmatického prostoru membrán a vyvolat výměnu fosfolipidů mezi vnější a vnitřní membránou. Tato výměna vede ke ztrátě specifické fosfolipidové skladby v membránách a může dojít k osmotické nerovnováze, která má za následek lýzi buňky [13]. Tento mechanismus je zobrazen na obr 4 (b).



Obr 4: Mechanismy baktericidních účinků kolistinu [13]

Byl také popsán alternativní mechanismus účinku kolistinu uvnitř buňky, který je založen na oxidačním stresu způsobeným tvorbou reaktivních forem kyslíku (superoxid, peroxid vodíku a hydroxylový radikál). Nahromaděné reaktivní formy kyslíku jsou pak schopny poškozením DNA, lipidů a proteinů způsobit smrt buňky [13]

2.2 Rezistence

Antimikrobiální rezistence je širší termín, který zahrnuje rezistenci různých typů mikroorganismů (bakterie, viry, parazity, mikroskopické houby) k léčbě antimikrobiálními látkami (antibiotika, antivirotika, antiparazitika, antitykotika). Antimikrobiální rezistence se může vyskytovat u mikroorganismů přirozeně, kdy se jedná o tzv. přirozenou (primární) rezistenci, anebo může být získána v průběhu života (sekundární rezistence) [14].

Kvůli rozšiřování rezistence k běžně používaným antibiotikům se musela začít používat tzv. antibiotika „poslední záchrany“, mezi něž patří právě kolistin. Bohužel, jejich nadměrným používáním, ale došlo také k výskytu a šíření rezistentních bakterií [15].

Rozšiřováním antimikrobiální rezistence k dané látce se zvyšuje nejen riziko šíření nemoci v populaci, ale také horší průběh onemocnění a v důsledku toho i častější úmrtí. Bylo zjištěno, že infekce způsobené rezistentními bakteriemi vůči antibiotikům sebou přináší vyšší pravděpodobnost komplikací a až třikrát vyšší pravděpodobnost úmrtí. V důsledku neúčinnosti antibiotik a oslabení imunity organismu je totiž větší pravděpodobnost, že dojde k nakažení jinými infekcemi. Velký vliv mají v tomto ohledu tzv. nozokomiální infekce, tedy infekce spojené se zdravotní péčí (infekce získané v nemocnicích, v léčebnách pro dlouhodobě nemocné, v sanatoriích nebo při domácí péči) [16].

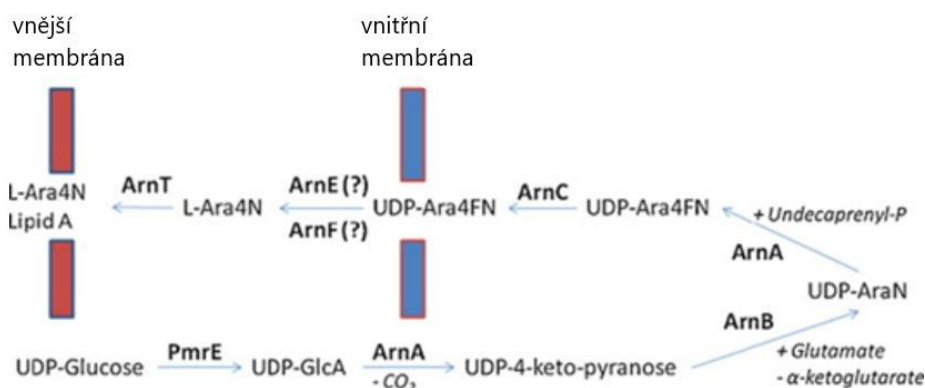
Hlavním důvodem rozšiřování bakterií rezistentních k antibiotikům v životním prostředí je nepotřebné anebo nadměrné užívání antibiotik nejen v humánním lékařství, ale také jejich nadměrná aplikace ve veterinární sféře. Jelikož jsou bakterie součástí normální střevní mikrobioty, tak nadbytkem přítomných antibiotik v organismu může dojít k rozvoji rezistence u jinak citlivých bakterií na dané antibiotikum. Vylučovanými exkrementy pak dochází nejen ke kontaminaci samotnou látkou, ale také k rozšiřování rezistentních bakterií do okolního prostředí, ve kterém může docházet k dalším nákazám jak zvířat, tak i lidí [16].

2.2.1 Mechanismus rezistence bakterií ke kolistinu

2.2.1.1 Modifikace lipidu A a kyseliny ketodeoxyoktulosonové

Modifikace lipidu A anebo kyseliny ketodeoxyoktulosonové (Kdo), které jsou součástí lipopolysacharidů ve vnější membráně, patří mezi hlavní mechanismy rezistence ke kolistinu. Tyto modifikace bývají nejčastěji způsobeny substitucí 4-amino-4-deoxy-L-arabinozou (L-Ara4N) nebo fosfoetanolaminem (PEtN). Jejich navázáním na lipid A nebo kyselinu ketodeoxyoktulosonovou se snižuje negativní náboj vnější membrány, díky čemuž se snižuje afinita pozitivně nabitého kolistinu. Modifikace lipidu A nebo Kdo pomocí PEtN je hlavním mechanismem rezistence u *Acinetobacter baumannii*. Oproti tomu modifikace pomocí L-Ara4N je častější a vyskytuje se v různých obměnách např. u *Salmonella* spp., *K. pneumoniae*, *E. coli* a *P. aeruginosa* [17].

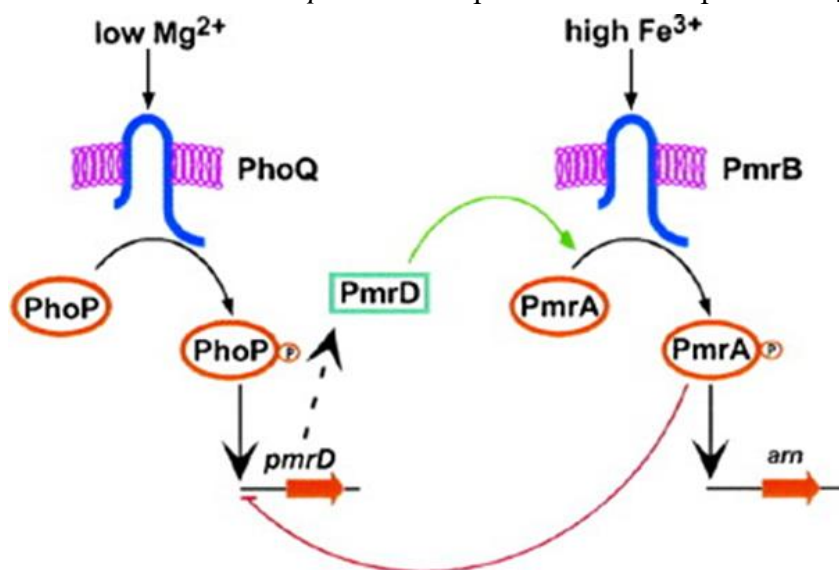
U *Salmonella* spp., *K. pneumoniae* a *Escherichia coli* byl nalezen operon *arnBCADTEF* (dříve *pmrHFIJKLM*), který syntetizuje L-Ara4N z UDP-glukózy a následně ji přenáší na lipid A, kde je jejím nejčastějším cílem 4'-fosfátová skupina (případně 1'-fosfátová skupina) [17]. Proces syntézy L-Ara4N (obr 5) začíná dehydrogenací UDP-glukózy na UDP-glukuronovou kyselinu (UDP-GlcA). UDP-GlcA následně podléhá dekarboxylaci a transaminaci, přičemž vzniká UDP-aminoarabinoza (UDP-AraN). Ta je poté formylována na UDP-Ara4FN a přenesena přes vnitřní membránu. UDP-Ara4FN je následně deformylována na L-Ara4N a přenesena na lipid A [18].



Obr 5: Proces syntézy L-Ara4N [18]

Biosyntéza L-Ara4N je regulována dvousložkovými regulačními systémy, PmrA/PmrB anebo PhoP/PhoQ [19]. PmrB je cytoplazmatická senzorová kináza s navázaným histidinovým zbytkem, která se aktivuje vysokou koncentrací Fe^{3+} nebo nízkým pH. Po aktivaci fosforyluje

PmrA, což je přímý regulátor operonu *arnBCADTEF* pro biosyntézu L-Ara4N. PhoQ je dalším senzorem v cytoplazmatické membráně, který je naopak aktivován nízkými koncentracemi Mg^{2+} nebo Ca^{2+} kationtů. Po aktivaci fosforyluje regulátor PhoP, který zase aktivuje transkripci operonu *pmrD*. PmrD (supresor) má ochrannou roli tím, že inhibuje defosforylaci PmrA v druhém systému, čímž podporuje transkripci operonu *arnBCADTEF*. PmrA uplatňuje negativní zpětnou vazbu tím, že potlačuje transkripci *pmrD* za podmínek, které aktivují PmrA. Tento dvousložkový regulační systém byl popsán u bakterie *Salmonella* spp. a je znázorněn na obr 6 [18]. Regulační systémy se v bakteriích nachází v různých variantách. Např. bakterie *Y. pestis* neobsahuje PmrD a oba systémy mohou přímo podporovat transkripci operonu *arn*. U *E. coli* naopak transkripce *pmrD* probíhá, ale PmrD nereguluje systém PmrA/PmrB. U *P. aeruginosa* je systém PmrA/PmrB regulován koncentracemi Mg^{2+} . Regulační systém PhoP/PhoQ může u bakterií *Klebsiella pneumoniae* přímo aktivovat operon *arn* [18].



Obr 6: Dvousložkový regulační systém rezistence u *Salmonella* spp [18]

2.2.1.2 Tvorba kapsulárních polysacharidů

U *K. pneumoniae* bylo zjištěno, že je schopna vylučovat kapsulární polysacharidy (CPSs) ze svého povrchu. Po svém uvolnění jsou schopné zachytávat anebo se vázat na kolistin, čímž se snižuje množství kolistinu, které se dostává k povrchu bakteriální buňky. Základním mechanismem je v tomto případě elektrostatická interakce mezi kladně nabitým kolistinem a záporně nabitým CPS [20].

2.2.1.3 Efluxní pumpy

Efluxní pumpy jsou proteinové transportéry, které vylučují antimikrobiální látky z prostoru buňky. Jejich velkým negativem je, že mohou často za rozvoj multirezistentních kmenů, jelikož se vyznačují širokou specifitou. Bylo popsáno mnoho druhů efluxních pump a systémů, které se uplatňují u rezistence ke kolistinu [17].

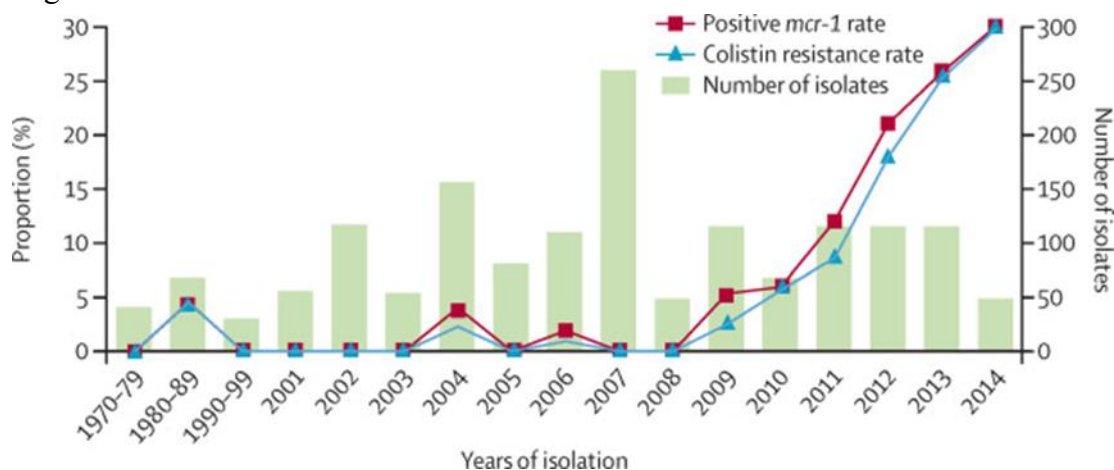
2.2.1.4 Kompletní ztráta LPS

Úplná ztráta LPS jako mechanismus rezistence byla popsána u *Acinetobacter* sp. Jde o mutaci vyskytující se v biosyntetické dráze lipidu A (*lpxA*, *lpxB*, *lpxC*), která ukončuje jeho syntézu

a tvorbu LPS. Mutace v LptD (protein ve vnější membráně, který umožňuje konečné umístění nově syntetizovaného LPS) také může vést k úplné ztrátě LPS [17].

2.2.1.5 Rezistence kódovaná plazmidovým genem *mcr*

Původně byla rezistence ke kolistinu spojována pouze s mechanizmy chromosomální mutace v dané bakterii a jejich přenosem na potomky. Nicméně v rámci čínského projektu při sledování rezistence bakterie *E. coli* u hospodářských zvířat byla zpozorována zvýšená rezistence ke kolistinu. Po dalších analýzách byl v roce 2015 popsán první plazmidem zprostředkovaný mechanismus rezistence ke kolistinu. Tento gen *mcr-1* (mobilized colistin resistance), přenášen horizontální cestou, kóduje fosfoetanolamin-transferázu, která přidává PETN na lipid A ve vnější membráně. Pozitivně nabitý kolistin pak není schopen se vázat na pozitivně nabitý lipopolysacharid a způsobit tak následnou lýzi buňky [21]. V následujícím roce byl publikován článek [22], ve kterém byla popsána retrospektivní studie na izolátech *E. coli* zkoumající přibližnou dobu vzniku genu *mcr-1* u hospodářských zvířat. Testy na přítomnost genu *mcr-1* pomocí metody PCR byly provedeny na izolátech bakterií *E. coli* pocházejících z farem od roku do 1970 do roku 2014. Z 80. let 20. století, kdy se v Číně začal kolistin podávat hospodářským zvířatům, byly zaznamenány tři izoláty, ve kterých byl gen *mcr-1* detekován. Jak je vidět na obr 7, zvýšený výskyt genu *mcr-1* byl od roku 2009. Až do roku 2014 se hospodářským zvířatům podávalo 2470–2875 tun kolistinu ročně, což výrazně přispělo k rychlému rozvoji a šíření genu *mcr-1*.



Obr 7: Přítomnost genu *mcr-1* u *E. coli* v letech 1970–2014 [22].

V následujících letech byly identifikovány další geny *mcr* nejen v Číně, ale i v dalších zemích světa. V roce 2016 byl v Belgii u *E. coli* (prasečího a hovězího původu) identifikován gen *mcr-2*, jehož prevalence byla dokonce vyšší (11/53) než u genu *mcr-1* (7/53) [23]. Gen *mcr-3* byl identifikován následující rok u *E. coli* ve vzorcích prasečího původu v jihovýchodní Asii a Severní Americe [24]. Ve stejném roce byly v Evropě také popsány geny *mcr-4* (*Salmonella enterica* a *E. coli*) [25], *mcr-5* (*Salmonella enterica*) [26] a *mcr-6* (*Moraxella*) [27]. V roce 2018 byl v Číně popsán gen *mcr-7* u *Klebsiella pneumoniae* [28]. Taktéž byla zaznamenána u *Klebsiella pneumoniae* koexistence genu *mcr-8* a genu produkujícího enzym New Delhi metalo-beta-laktamázu (enzym způsobující rezistenci bakterií k antibiotikům ze skupiny karbapenemů) jak u hospodářských zvířat, tak u lidských vzorků [29]. Další plazmidový gen

(*mcr-9*) byl identifikován v roce 2019 u multirezistentní bakterie *Salmonella enterica* [30]. Zatím poslední byl identifikován gen *mcr-10* u *Enterobacter roggenkampii* v roce 2019 [31].

Na základě NDARO (National Database of Antibiotic Resistant Organisms) a publikovaných studií byl v roce 2020 shrnut výskyt a epidemiologický charakter všech do té doby známých *mcr* genů v jedné studii [32]. Nejrozšířenějšími geny byly *mcr-1*, který byl detekován v 61 zemí (obr 8), a *mcr-9* detekován ve 40 zemí (obr 9). Ve 22 zemích byl detekován *mcr-3* a v 15 zemích *mcr-5*. Další geny *mcr* byly rozšířeny jen v pár oblastech (*mcr-2*, *mcr-4*, *mcr-7* a *mcr-8*). O výskytu genu *mcr-6* je doposud jen jedna zpráva z Velké Británie.

Podle údajů NDARO je většina *mcr*-pozitivních izolátů omezena na různé druhy *Enterobacteriaceae*, především na *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter* spp. Například gen *mcr-3* převládá u *Aeromonas* spp., *mcr-8* je přítomný hlavně u *Klebsiella pneumoniae* a *mcr-9* je nejběžnější u *Salmonella enterica* [32].



Obr 8: Rozšíření genu *mcr-1* k roku 2020 (oranžová barva) [32]



Obr 9: Rozšíření genu *mcr-9* k roku 2020 (oranžová barva) [32]

2.3 Veterinární lékařství

Jedním z hlavních důvodů kontaminace životního prostředí kolistinem je jeho nepotřebná a nadměrná aplikace v zemědělské produkci. Nadměrné množství kolistinu či kolistimethátu nedokáže organismus dobytka metabolizovat, a tak jeho velká část odejde spolu s vylučovanými exkrementy. Tzv. kejda je poté aplikována na zemědělské půdy jako hnojivo za účelem dodání živin. Tímto způsobem se tak dostává kolistin do půdy, kde může mít negativní vliv na živé organismy a může docházet k rozvoji a šíření rezistence bakterií.

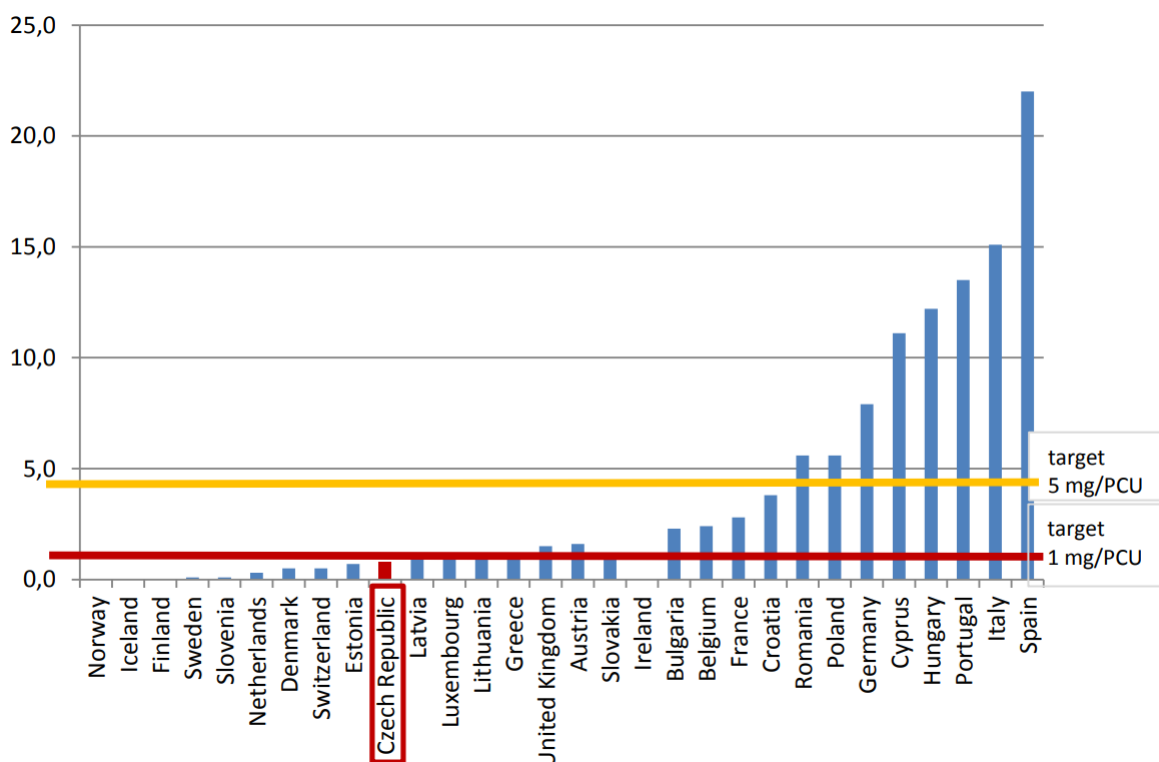
Kvůli odolnosti bakterií k jiným skupinám antibiotik, spotřeba kolistinu prudce vzrůstala. Ve veterinárním lékařství v Evropské unii se tak kolistin stal dokonce jedním z pěti nejvíce podávaných antibiotik hospodářským zvířatům. Aplikoval se nejen k léčbě onemocnění, ale také k zabránění progresu nevyléčitelného onemocnění (metafylaxe), jako ochrana před určitou nemocí (profylaxe) a celkově jako prevence. Taktéž bylo rozšířené podávání antibiotik (mezi něž patřil i kolistin) hospodářským zvířatům jako stimulanty růstu a produkce. V roce 2006 byla v Evropské unii aplikace antibiotik využívaných jako stimulanty růstu zakázána. Nicméně preventivní podávání kolistinu proti nemocím se začalo významně omezovat až po objevení rezistenci kódujících plazmidových genů v roce 2015, kdy vyvstal velký problém šíření rezistence bakterií horizontální cestou [21]. V důsledku toho Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) rozhodla minimalizovat podávání kolistinu hospodářským zvířatům, a omezit tak jeho použití jen na nezbytnou léčbu onemocnění a řádně odůvodněnou metafylaxi [51, 52].

V roce 2019 byla vydána zpráva [53] o spotřebě antimikrobik ve veterinární medicíně v České republice v letech 2010-2017 (obr 10). Zpráva zahrnovala tedy i spotřebu kolistinu v jednotlivých letech, nejen kvůli velké spotřebě u hospodářských zvířat, ale také kvůli skutečnosti, že jde z pohledu humánní medicíny o antibiotikum „poslední záchrany“. Spotřeba kolistinu v České republice klesla v období 2013 až 2017 o 45 %. Jak je vidět na obr 11, patří Česká republika k roku 2016 mezi země se spotřebou kolistinu pod 1 mg/PCU, což je hodnota, kterou Evropská unie stanovila jako cíl, pod kterou se má snížit spotřeba kolistinu v členských

zemích. V návaznosti na cíle Akčního plánu Národního antibiotického programu České republiky na období 2019-2022 bylo u kolistinu spolu s antimikrobiky s indikačním omezením, naplánováno detailnější sledování s cílem minimalizovat jejich podávání i v dalších letech.

Skupina antimikrobik	2010 [kg]	2011 [kg]	2012 [kg]	2013 [kg]	2014 [kg]	2015 [kg]	2016 [kg]	2017 [kg]
Tetracykliny	28 206,58	28 006,53	20 018,10	19 302,82	19 999,52	16 862,10	15 014,41	13 037,05
Peniciliny	17 766,90	12 166,56	12 653,13	14 132,42	13 589,16	12 691,95	11 783,68	12 544,10
Sulfonamidy	10 279,18	9 728,51	8 620,64	9 308,82	9 122,54	7 436,34	7 097,49	7 534,53
Diterpeny (Pleuromutiliny)	4 276,80	2 806,89	3 156,92	2 737,45	3 379,77	2 745,19	2 521,29	2 969,10
Makrolidy	4 007,50	2 475,29	3 855,98	2 622,17	4 108,68	2 684,20	2 381,96	2 511,05
Aminoglykosidy	2 439,16	2 325,52	1 745,45	2 430,50	1 651,58	1 829,62	1 395,17	1 852,85
(Fluoro)chinolony	1 174,07	1 244,50	1 294,22	1 320,91	1 277,15	1 235,40	1 237,92	1 358,92
Amfenikoly	815,53	274,62	377,06	312,04	324,08	324,1	275,71	942,75
Trimethoprim a deriváty	738,48	690,28	764,59	958,77	1 384,52	1 183,11	725,27	820,93
Polymyxiny	673,53	421,71	615,99	769,32	736,50	690,84	589,93	418,20
Cefalosporiny	633,55	557,32	472,71	766,47	797,54	849,5	904,51	777,25
Ostatní	326,60	674,50	410,32	397,87	377,37	196,76	163,29	107,70
Linkosamidy	254,62	226,21	299,94	343,80	235,13	169,5	140,99	120,95
Imidazolové deriváty	41,04	41,63	33,39	43,72	39,40	39,25	43,72	51,37
Ansamyciny	2,88	4,43	42,50	54,41	49,09	52,1	48,42	49,16
	71 636,42	61 644,50	54 360,95	55 497,63	57 072,02	48 989,96	44 323,76	45 095,91

Obr 10: Celkové spotřeby antimikrobik v ČR v letech 2010-2017 [53]



Obr 11: Porovnání spotřeb kolistinu v Evropské unii v roce 2016 (mg/PCU) [53]

2.3.1 Ekotoxická kolistinu

Kromě šíření rezistence bakterií v životním prostředí, jsou také studovány toxické účinky na člověka. Byly prokázány především neurotoxické a nefrotoxické účinky. Nicméně ekotoxikologických výzkumů zabývajících se účinky kolistinu na půdní či vodní organismy je

nedostatečné množství. Přitom půda je první složkou životního prostředí, do které se netransformovaný kolistin skrze výměšky hospodářských zvířat může dostávat. Z půdy může být následně kolistin transportován do vod a kontaminovat tak další prostředí a organismy (obr 12).



Obr 12: Šíření léčiv v životním prostředí [58]

Žížaly jsou důležité půdní organismy, které udržují úrodnost půdy prostřednictvím jejich základních fyziologických činností a jsou často bioindikátorem zdravého půdního ekosystému. Díky jejich schopnosti bioakumulace jsou proto používány pro testování toxicity v půdním prostředí. V jedné studii [59], kdy byly žížaly hnojní (*Eisenia fetida*) vystavovány denním dávkám kolistinu, které jsou podávány hospodářským zvířatům, byly detekovány patologické změny nejen ve střevním epitelu, ale také se zvýšila exprese HSP70 a inhibovala se exprese genu metalothioneinu. Další studie [60] na myších naznačuje, že kolistinem indukovaná mitochondriální dysfunkce může mít částečně vliv na rozvoj neurotoxicity. Dá se předpokládat, že kolistin představuje nejen toxikologický problém pro člověka, ale také značné ekotoxikologické riziko pro půdní, případně akvatické organismy.

2.4 Analýza kolistinu

V dnešní době se většina studií zabývá analýzou kolistinu a CMS v biologických tekutinách, jako je krev, plazma a moč [34, 36, 44, 45]. Jedná se především o farmakokinetické studie, které studují přeměnu CMS na kolistin po jeho podání. Faktory, které tuto konverzi v těle ovlivňují, jsou např. čas, teplota, pH a matrice podávané formy. Během laboratorní analýzy má vliv na stabilitu CMS celkový čas analýzy od přípravy vzorku po detekci na detektoru, skladovací podmínky, typ biologické tekutiny a chemikálie použité při jednotlivých krocích analýzy. Proto je v těchto studiích potřeba sledovat jakoukoliv potenciální přeměnu CMS na kolistin od odběru vzorku až po jeho analýzu.

Po zaznamenání zvýšeného výskytu rezistence bakterií ke kolistinu, které mělo souvislost s jeho nadměrným podáváním dobytku, se začali objevovat studie řešící extrakci a analýzu kolistinu z krmiv a kejdy [37, 38, 40, 42, 43, 48]. Kejda totiž může obsahovat zbytky nemetabolizovaného kolistinu a aplikací na zemědělské půdy dochází k její kontaminaci. To představuje velký problém, jelikož může docházet nejen k šíření kolistinu do dalších složek životního prostředí, ale také k rozvoji a šíření rezistentních kmenů bakterií. Bohužel, studie zabývající se analýzou kolistinu v půdě se nevyskytují, a proto je potřeba vyvinout extrakční a analytickou metodu pro detekci kolistinu v půdě.

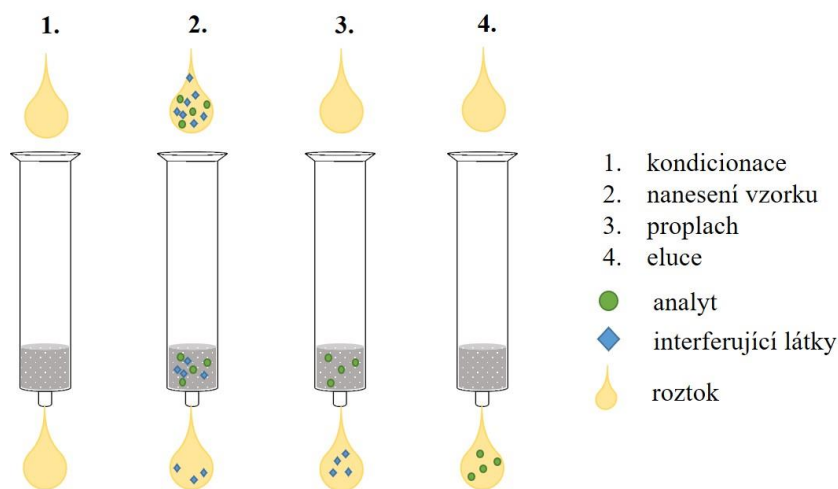
2.4.1 Příprava vzorků obsahující kolistin

Příprava vzorku je kritickým krokem při stanovování jakéhokoliv analytu ve vzorcích ze životního prostředí, jelikož matrice obsahuje kromě samotného analytu i mnoho vedlejších látek. Tyto látky mohou se stanovovaným analytem interagovat nebo ovlivňovat metody jeho stanovení a způsobovat tak interference (matriční efekt) během samotné analýzy. Aby bylo možné provést spolehlivou kvantitativní analýzu, musí se matriční efekty v největší míře eliminovat již při přípravě vzorku. K extrakci kolistinu v případě biologických materiálů se využívá především tří metod: extrakce na tuhé fázi SPE, srážení proteinů a kombinace srážení proteinů s následným přečištěním na kolonkách SPE.

Metoda založená na srážení proteinů se využívá nejčastěji, jelikož většina biologických tekutin obsahuje proteiny, které způsobují značné interference při stanovování. Používanými rozpouštědly jsou methanol a acetonitril v kombinaci s kyselinou trichloroctovou či trifluoroctovou. Poté může následovat přečištění a zakoncentrování na kolonce SPE [36, 39]. Samotná metoda extrakce na tuhé fázi se používá pro biologické vzorky méně často. Jde především o to, že metoda vyžaduje delší čas extrakce, při kterém by mohlo docházet ke konverzi CMS na kolistin. Jde především o to, že metoda vyžaduje delší čas extrakce, při kterém by mohlo docházet ke konverzi CMS na kolistin. Pro analýzu půd se však jeví tato metoda jako vhodná, jelikož je potřeba půdní vzorek přečistit od interferujících látek.

Metoda SPE spočívá obecně v zachycení sledovaných analytů na sorbentu a jejich následného uvolnění elucí vhodným rozpouštědlem. SPE zahrnuje čtyři základní kroky, které jsou totožné pro všechny typy kolonek. Prvním krokem je příprava kolonky neboli kondicionace, kdy se nejdříve nanáší nejčastěji methanol a poté rozpouštědlo se stejnými nebo podobnými vlastnostmi jako má vzorek. Druhým krokem je nanesení vzorku, při kterém se zachycuje sledovaný analyt na stacionární fázi kolonky. Třetím krokem je promytí, během

něhož se odstraní interferující látky. V posledním kroku dochází k eluci analytu vhodným rozpouštědlem. Jednotlivé kroky extrakce na SPE kolonkách jsou zobrazeny na obr 13. Pro jednotlivé kroky SPE při extrakci kolistinu se používají různá rozpouštědla, jako např. voda, methanol či acetonitril smíchaný s různými koncentracemi kyseliny mravenčí, octové či trifluoroctové. Po SPE se eluát téměř vždy vysuší pod proudem dusíku a poté se kolistín rozpustí v rozpouštědle vhodném pro následnou analýzu.



Obr 13: Obecná metoda SPE

Jako stacionární fáze se většinou využívá hydrofilně lipofilní sorbent HLB, např. Oasis HLB [36, 39] umožňující zachycení polykationtového kolistinu. Sorbent HLB je tvořen vodou smáčitelným polymerem (kopolymer N-vinylpyrrolidinu a divinylbenzenu), který vykazuje velkou stabilitu v širokém rozsahu pH (0-14) a má také velkou účinnost při zachytu polární látek. Jako další se používají kolonky WCX [37, 38], jejichž sorbent je tvořen slabým katexem (silikagel s navázanou karboxylovou kyselinou), který je schopný zachytávat slabé i silné báze. Dále jsou používány kolonky SCX obsahující navázanou benzensulfonovou kyselinu na oxidu křemičitém (funguje jako silný katex).

V případě analýzy tělních tkání zvířat, krmiv a hnoje je potřeba kolistín extrahovat z pevné matrice. Využívají se pro to extrakční roztoky (různé směsi methanolu, vody či kyseliny mravenčí), míchání na vortexu, extrakce v ultrazvukové lázni a následná centrifugace k oddělení pevné a kapalné fáze. Po této extrakci následuje přečištění a zakoncentrování na kolonkách SPE [37, 38, 40, 41]. Oproti klasické extrakci a následnému přečištění na SPE kolonkách, byla také vytvořena metoda založená na MSPD extrakci (Matrix Solid Phase Dispersion) [42]. Její výhodou je, že v jednom procesu zahrnuje homogenizaci vzorku, frakcionaci a čištění. Metoda byla použita pro analýzu kolistinu v krmivem za použití sorbentu C18. Další metodou bylo využití disperzní extrakce na pevné fázi (DSPE), kdy byl získaný extrakt smíchaný se sorbentem PSA (Primary Secondary Amine) a po centrifugaci byl supernatant analyzován [43].

Postupy vybraných příprav a extrakcí jsou přehledně shrnuty v tabulce tab 2. Jedná se o články, ze kterých bylo vycházeno v experimentální části diplomové práce, jelikož studie zabývající se extrakcí kolistinu z půdy se doposud nevyskytují.

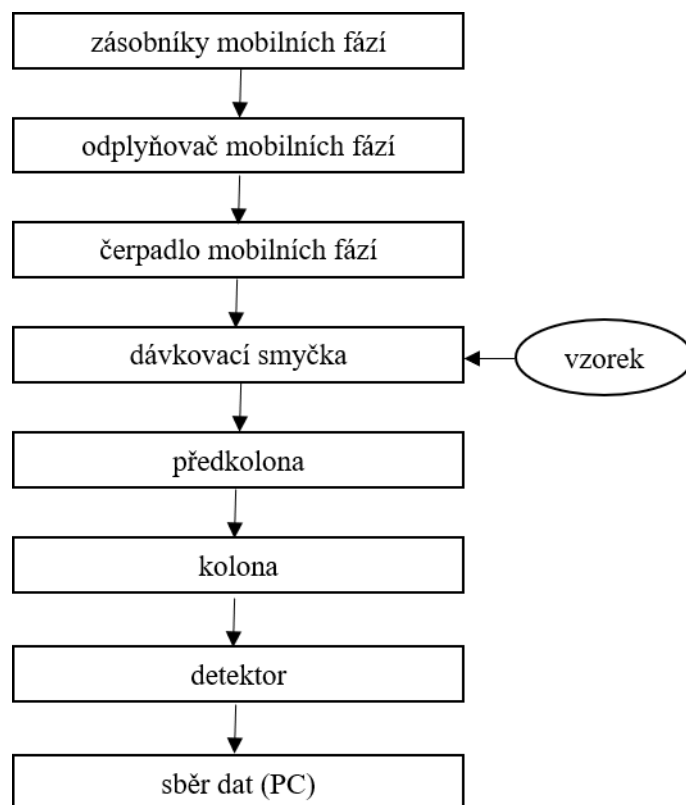
Tab 2: Možnosti stanovení kolistinu z různých typů matrice

vzorek	extrakční roztok	SPE				analýza			
		kolonka	kondicionace	proplach	eluce	přístroj	kolona	mobilní fáze	LOQ
zvířecí tkáň, mléko [35]	6M HCl	Strata-X	MeOH, H ₂ O	Et ₂ O, 2% aceton/ H ₂ O, H ₂ O	0,2% HCOOH/MeOH (3/7; v/v)	HPLC/MS/MS	Luna C18	A: 0,1% HCOOH/ACN; B: 0,1% HCOOH/H ₂ O	tkáň: 150 µg/kg mléko: 50 µg/kg
plazma, moč [36]	MeOH/10% TFA (1/1, v/v)	Oasis HLB	MeOH, H ₂ O	H ₂ O	0,1% HCOOH/MeOH	HPLC/MS/MS	C18 Xbridge	A: 0,1% HCOOH/ACN; B: 0,1% HCOOH/H ₂ O	A: 0,024 µg/ml B: 0,015 µg/ml
zvířecí tkáň, mléko, krmivo [37]	10% TCA/ACN (40/60, v/v)	Oasis WCX	MeOH, H ₂ O	H ₂ O, MeOH, 5% HCOOH	20% HCOOH/MeOH	UHPLC/MS/MS	Acquity BEH C18	A: 0,5% HCOOH/H ₂ O; B: HCOOH/ACN	5-30 µg/kg
hnůj [38]	10% TCA/ACN (40/60, v/v)	Oasis WCX	MeOH, H ₂ O	H ₂ O, MeOH, 5% HCOOH	20% HCOOH/MeOH	UHPLC/MS/MS	Acquity BEH C19	A: 0,5% HCOOH/H ₂ O; B: HCOOH/ACN	10 µg/kg
zvířecí ledviny a játra [39]	4% TCA/ACN	Oasis HLB	MeOH, H ₂ O	H ₂ O	ACN	HPLC/MS/MS	Alltima C18	A: 0,1% HCOOH/ACN; B: NH ₄ HCO ₂ /HCOOH/ACN/H ₂ O (1/5/50/950; v/v/v/v)	50 µg/kg
kejda [40]	6% TCA/ACN	x	x	x	x	UHPLC/MS/MS	Kinetex C18	A: H ₂ O/ACN (95/5)+0,5% HCOOH + 0,1% NH ₄ HCO ₂ ; B: ACN + 0,1% HCOOH	A: 67 µg/kg B: 50 µg/kg
rybí tkáň [41]	MeOH/H ₂ O (5/4, v/v) + 10M HCl	PLS	MeOH, H ₂ O	H ₂ O	HCOOH/MeOH/H ₂ O (0,2/70/30, v/v/v)	UPLC/MS/MS	Acquity BEH C18	A: 0,2% HCOOH/ACN; B: 0,2% HCOOH/H ₂ O	40 µg/kg
krmivo [42]	x	MSPD (C18)	H ₂ O, H ₂ O/MeOH (80/20, v/v)	x	0,2% HCOOH/MeOH	LC/MS/MS	Hypersil Gold C18	A: 0,1% HCOOH/ACN; B: 0,1% HCOOH/H ₂ O	A: 25 µg/kg B: 25 µg/kg
krmivo [43]	MeOH/2% HCOOH (2/5, v/v)	DSPE (PSA)	x	x	x	LC/MS/MS	Kinetex Biphenyl	A: 0,1% HCOOH/ACN; B: 0,1% HCOOH/H ₂ O	A: 30 µg/kg B: 30 µg/kg
plazma [45]	MeOH/10% TCA (50/50, v/v)	Oasis HLB	MeOH, H ₂ O	H ₂ O	MeOH/H ₂ O/HCOOH (80/19/1, v/v/v)	LC/MS/MS	Zorbax eclipse plus C18	ACN/H ₂ O/HCOOH (30:70:0,1%; v/v/v)	0,5 µg/ml
krmivo [46]	0,5M HCl	Oasis HLB	MeOH, H ₂ O	H ₂ O	MeOH/H ₂ O/HCOOH (70/29,8/0,2)	UHPLC/MS/MS	Acquity UPLC HSS T3	A: 0,05% HCOOH/H ₂ O; B: ACN	300 µg/kg
hnůj [47]	0,04M EDTA, McIlvainův pufr pH4	Oasis HLB	MeOH, 0,04 M EDTA	H ₂ O	MeOH/HCOOH (98/2; v/v)	HPLC/MS/MS	C18 Security Guard	A: 0,1% HCOOH/ACN; B: 0,1% HCOOH/H ₂ O	400 µg/kg
kejda [48]	20% TCA/H ₂ O (50/50; v/v); 20 mM K ₂ HPO ₄	WP CBX	MeOH, H ₂ O, 20 mM K ₂ HPO ₄	H ₂ O	10% HCOOH/MeOH	LC/MS/MS	Atlantis HILIC silica	A: H ₂ O; B: 1% HCOOH/ACN	LOD: 25 µg/kg

2.4.2 Kvantitativní stanovení kolistinu

Pro stanovení kolistinu v biologických vzorcích se v dnešní době používá téměř výhradně kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Díky tomuto spojení získáváme záznam intenzity vybraných hmot m/z v čase.

V případě kapalinové chromatografie se využívá nejčastěji vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC, UPLC). Na rozdíl od HPLC, umožňuje UPLC (UHPLC) separaci za vysokých tlaků při použití kolon s částicemi menšími než 2 μm . UPLC (UHPLC) má tak řadu výhod, např. kratší dobu analýzy, zvýšení separační účinnosti a snížení meze detekce. Obecné schéma kapalinového chromatografu je na obr 14.

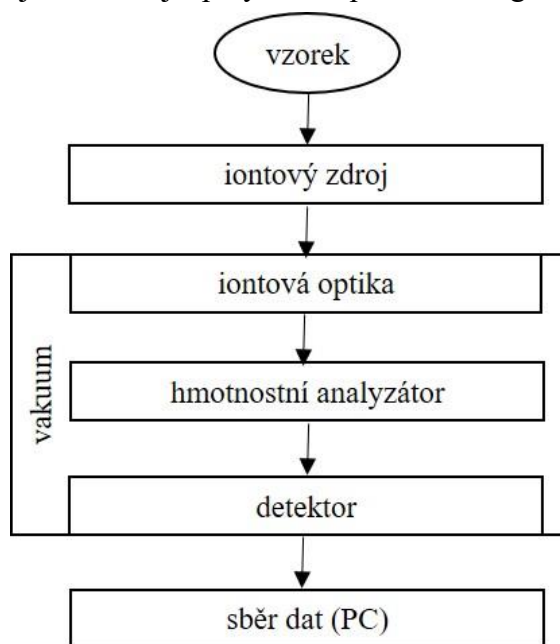


Obr 14: Obecné schéma kapalinového chromatografu

Chromatografická separace kolistinu se provádí především v reverzním systému (nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze), kdy se využívá interakce hydrofobní mastné kyseliny kolistinu s nepolární stacionární fází [39, 40, 42]. Stacionární fáze je tvořena silikagelem s navázanými nepolárními alifatickými uhlovodíky (oktadecyl C18, oktyl C8). Jelikož všechny silanolové skupiny nejsou obsazeny alkylovými řetězci, tak může docházet k interakci mezi primárními aminy v kolistinu a volnými silanolovými skupinami. Tyto interakce pak vedou k chvostování píků a k jejich rozšiřování. Použitím gradientové eluce a směsi 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a 0,1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu v jedné studii dokázali tuto interakce s volnými silanolovými skupinami potlačit [35]. Pro snížení nechtěných interakcí s volnými silanolovými skupinami se ve studiích také využívají hybridní stacionární fáze na bázi silikagelu s částicemi menšími než 2 μm . Jejich nespornou výhodou je odolnost při širokém

rozsahu pH a také možnost pracovat za vysokých tlaků, díky čemuž se zlepšuje účinnost separace a tvar píků. Využívají se především kolony BEH (v systému UPLC) obsahující částice o velikosti 1,7 μm s ethylenovými můstky mezi silanolovými skupinami silikagelu, na kterém jsou navázané alifatické uhlovodíky (C8 nebo C18) nebo fenyl [36, 37, 41]. Kromě výběru vhodné kolony je potřeba věnovat také pozornost složení mobilních fází a gradientu eluce, aby došlo k dobré separaci mezi kolistinem A a B. Krom výše zmíněné směsi kyseliny mravenčí s vodou a kyseliny mravenčí s acetonitrilem, se používají jako mobilní fáze také směsi obsahující čistý acetonitril, methanol či mravenčan amonný.

Po chromatografické separaci následuje detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Obecné schéma hmotnostního spektrometru je zobrazené na obr 15. Pro spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií se využívají nejčastěji dvě techniky ionizace molekul: elektrosprej (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Pro analýzu kolistinu je výhradně upřednostňována ionizace pomocí elektrospreje, jelikož je vhodný pro polární a iontové sloučeniny. Většina studií také uvádí použití elektrospreje v pozitivním módu (ESI+), který generuje kladně nabitě ionty kolistinu A a B. Jelikož se jedná o měkkou ionizační techniku, generují se kladně nabitě ionty kolistinu ($[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$), případně aduktové ionty ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$). Nabitě ionty kolistinu a jejich hodnoty m/z jsou uvedeny v tab 3. K fragmentaci prakticky nedochází nebo jen zcela výjimečně v nevýznamném množství. Jako analyzátor se využívá nejčastěji trojitý kvadrupól (QqQ), případně iontová past (IT). Pro výběr prekurzorů pro analýzu v MRM módu (multiple reaction monitoring) je potřeba nejdříve provést sken hmot v určitém rozsahu m/z . Následně jsou vybrané prekurzory fragmentovány v kolizní cele a vybrány vhodné fragmentační produkty. V režimu MRM, se následně sledují nejméně dva hmotnostní přechody, které jsou definovány dvěma hodnotami m/z odpovídající prekurzoru a jeho produktu. Pro kvantifikaci se obvykle používá nejvíce intenzivní píky prekurzor/produkt, a pro potvrzení hmotnostní přechod, který má druhý nejintenzivnější píky nebo specifické fragmenty pro danou látku.



Obr 15: Obecné schéma hmotnostního spektrometru

Tab 3: Hodnoty m/z kolistinu A a B

iont	m/z	
	kolistín A	kolistín B
$[M + H]^+$	1170	1156
$[M + 2H]^{2+}$	586	579
$[M + 3H]^{3+}$	391	386
$[M + 4H]^{4+}$	293	290

2.4.2.1 Využití standardů

Pro kvantifikaci se využívá metoda vnitřního standardu, která není závislá na znalosti přesného objemu dávkovaného vzorku, ale využívá vztah mezi hmotnostmi a plochami píků analyzované sloučeniny a vnitřního standardu. Jelikož se na trhu nevyskytují izotopicky značené standardy kolistinu A a ani B, využívá se tak polymyxinu B jako interního standardu [36, 39, 40]. Polymyxin B je vhodná látka, jelikož se jedná o strukturně podobnou sloučeninu (liší se pouze v jedné aminokyselině) a má odlišný eluční čas oproti kolistinu.

2.4.2.2 Stabilita kolistinu

Problém konverze CMS na kolistín během přípravy vzorků je známý, avšak stabilitou kolistinu se mnoho studií nezabývá. V jedné studii [44] byla stabilita kolistinu testována ve třech různých médiích: ve vodě při 4 a 37 °C, v izotonickém fosfátovém pufru o pH 7,4 (0,067 M) při 37 °C a v lidské plazmě při 37 °C. Ze získaných dat vyplynulo, že ve vodě o 4 °C je kolistín stabilní i 60 den od uchování. V případě vody o teplotě 37 °C nedošlo k poklesu koncentrace ani po 120 dní od uchování. Oproti tomu v plazmě a pufru došlo k poklesu koncentrace již během prvních 24 hodin od uchování. V další studii [43] byl kolistín stabilní po dobu tři měsíce, pokud byl uchován v 0,1% kyselině mravenčí (pH = 3) při –20 °C. V případě zkoumání krátkodobé stability kolistinu při 25 °C, výtěžnost klesla již po dvou dnech 60 %. Dále byly roztoky matrice podrobeny pěti cyklům zmrazení a rozmrazení během jednoho dne, aby se odhadla stabilita při celkové přípravě vzorků před samotnou analýzou. Výsledky naznačily, že kolistín i polymyxin B měly tendenci se rychle degradovat už po dvou cyklech zmrazení a rozmrazení. Z toho vyplývá potřeba připravovat zásobní roztoky kolistinu pravidelně, aby se tak předešlo nesprávným výsledkům.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- MilliQ voda
- Methanol (LC/MS, VWR)
- Acetonitril (LC/MS, VWR)
- Kyselina mravenčí (LC/MS, Merck)
- Kyselina chlorovodíková, EDTA, kyselina trichloroctová, pevný K_2HPO_4 , NaOH, kyselina citrónová, Na_2HPO_4 (běžné chemikálie, čistota p.a.)

3.2 Použité standardy

- Kolistin sulfát (Sigma Aldrich)
- Kolistin E1 (Sigma Aldrich)
- Kolistin E2 (Sigma Aldrich)

3.3 Analyzovaná matrice

- Kontaminovaná půda zkušební stanice Chrlice ÚKZÚZ

3.4 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy HR-120-EC, A&D Instruments
- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s hmotnostním spektrometrem Agilent Ion Trap 6320 LC/MS
 - kolona: LUNA Omega Polar C18 (100x2,1 mm, 3 μ m) s předkolonou SecurityGuard ULTRA Cartridges (UHPLC C18 2,1 mm) od Phenomenex
- Kapalinový chromatograf Agilent 1290 s hmotnostním spektrometrem BRUKER EVOQ LC-TQ
 - kolona: Luna Omega Polar C18 (100x2,1 mm, 1,6 μ m) s předkolonou UHPLC Fully Porous polar C18 (2,1 mm)
- pH metr OrionStar A215, Thermo Scientific
- Centrifuga NF 800, Nüve
- Ultrazvuková vodní lázeň Kraintek 5
- Vakuová pumpa KNF LAB LABOPORT
- Vakuová past, J.T. Baker
- SPE extraktor SUPELCO
- SPE kolonky
 - Oasis HLB (Waters, 6 ml, 200 mg)
 - Oasis WCX (Waters, 6 ml, 150 mg)
 - SAX (Supelco, 6 ml, 200 mg)
 - StrataX (Phenomenex, 3 ml, 200 mg)
- Stříkačkové nylonové filtry (0,22 μ m), Chromservis
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.5 Odběr vzorků půdy

Reálné vzorky půd byly získány v rámci projektu [61], který se zabíral setrváním rezistentních bakterií (obsahující gen *mcr-1*) v zemědělské půdě a jejich vlivu na půdní mikrobiom.

Vzorky půdy byly odebírány z pozemku nacházejícím se v areálu zkušební stanice Chrlice ÚKZÚZ (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský). Před aplikací inokulované kejdy do půdy byl odebrán první půdní vzorek 26.5.2020. Inokulovaná kejda byla aplikována 4.6.2020. Druhý půdní vzorek byl odebrán 11.6.2020, třetí půdní vzorek 18.6.2020, čtvrtý půdní vzorek 2.7. 2020 a poslední vzorek 30.7.2020. Pomocí Edelmanovyho vrtáku bylo vždy odebráno 15 dílčích vzorků, které byly navzájem smíchány a na místě prosátý na 5 mm síť. Vzorky byly skladovány při teplotě -20°C .

3.6 První část

Před samotnou přípravou vzorků byla nejdříve vytvořena a optimalizována metoda pro HPLC/MS podle literatury. Poté následovala optimalizace extrakce kolistinu z modelových vzorků půdy, přečištění a zakoncentrování pomocí kolonek SPE.

Zásobní roztok kolistinu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven v roztoku 20% kyselině mravenčí v methanolu. Kalibrační řada standardu kolistinu (0,05–1 $\mu\text{g/ml}$) byla připravena následným ředěním v 20% methanolu v 0,01M kyselině mravenčí. Všechny připravené roztoky byly uchovávány při teplotě -20°C . Průběžně byl zásobní roztok opětovně připravován.

3.6.1 Optimalizace HPLC/MS

Optimalizace metody pro HPLC/MS probíhala se standardem kolistinu v roztoku methanol/0,01M HCOOH (20/80, v/v) o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$. Testovány byly celkem čtyři kolony s nepolárními stacionárními fázemi: Phenomenex (Kinetex C18, Biphenyl, Kinetex PSC18) a LUNA Omega Polar C18. Nejlepší separace kolistinu A a B proběhla na koloně LUNA Omega Polar C18 při gradientové eluci mobilní fáze. Na této koloně byla následně optimalizována celková metoda, jejíž konečné parametry jsou uvedeny v tab 4. V použitém hmotnostním spektrometru byla využívána iontová past jako analyzátor. Bylo snímáno hmotnostní spektrum v rozsahu m/z 50–650, pro kvantifikaci byly využity vybrané několikanásobně nabití ionty kolistinu A a kolistinu B. Konkrétní hodnoty m/z jsou uvedeny tab 5.

Tab 4: Parametry HPLC/MS

Parametry HPLC			
Objem nástřiku	10 μl		
Teplota kolony	35 °C		
Průtok mobilní fáze	0,32 ml/min		
Složení mobilní fáze	A: 0,01M HCOOH		
	B: acetonitril		
Gradient mobilní fáze	t (min)	A (%)	B (%)
	0	95	5
	15	20	80
	17	20	100
	20	5	95
Post time	8,5 min		
Parametry MS			
Tlak zmlžovacího plynu	25 psi		
Průtok sušícího plynu	10 l/min		
Teplota sušícího plynu	350 °C		
Ionizační mód	ESI+		
Mód	scan		
Rozsah skenovaných hmot	50–650 m/z		

Tab 5: Sledované hmoty kolistinu A a kolistinu B (HPLC/MS)

	m/z			retenční čas (min)
	$[M + 2H]^{2+}$	$[M + 3H]^{3+}$	$[M + 4H]^{4+}$	
Kolistin A	586,5	390,6	293,2	6,7
Kolistin B	578,5	385,9	289,7	6,3

3.6.2 Optimalizace extrakce a zakoncentrování kolistinu

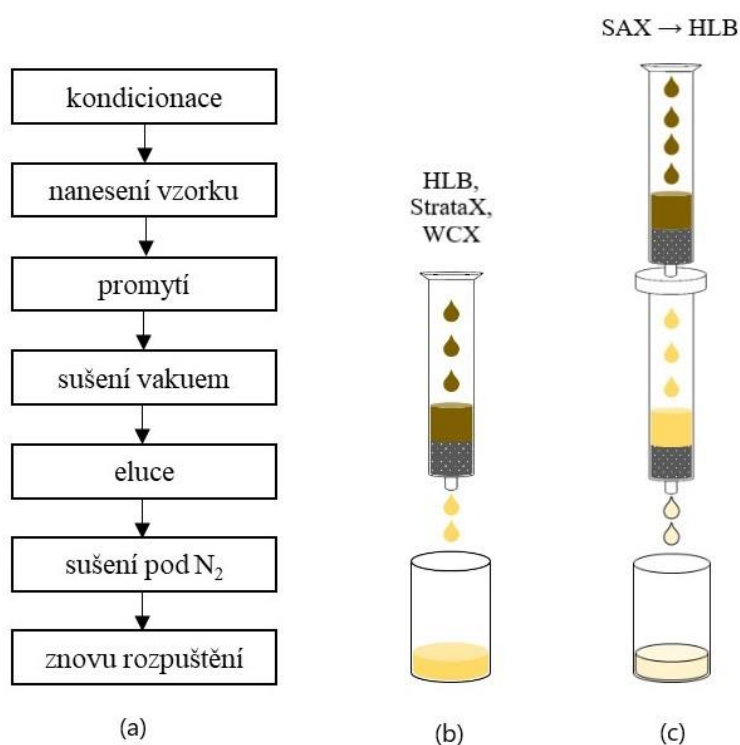
Z nastudované literatury byly vybrány extrakční postupy, ze kterých se vycházelo při přípravě vzorků. Tento výběr je uveden v tab 6 a obsahuje také některé postupy částečně upravené, které byly vytvořeny během probíhající experimentální práce. Modelové experimenty pro optimalizaci extrakce byly provedeny se vzorkem půdy odebrané před aplikací kejdý obsahující kolistin. Pro testování extrakce a přečištění na kolonkách SPE byl ke vzorkům přidáván 1 μ g, 10 μ g nebo 100 μ g kolistinu. Pro testování vlivu matrice na analýzu byly připraveny samotné extrakty půdy bez předchozího přídavku kolistinu. Kolistin byl přidán až po extrakci.

3.6.2.1 Obecný postup

2 g vysušené půdy (laboratorní teplota, 24 hod.) byly naváženy do extrakční zkušavky a případně přidán kolistin. Půda byla promíchána a ponechána 30 minut stát při laboratorní teplotě. K vzorku bylo přilito 10 ml extrakčního roztoku a směs byla 1 min promíchána

na vortexu. Vzorek byl umístěn na 10 min do ultrazvukové lázně a následně do centrifugy (10 min, 4100 ot/min). Supernatant byl odlit do vialky a celý postup byl opakován. Byl tak získán extrakt o celkovém objemu 20 ml. Extrakt byl poté přečištěn a zakoncentrován pomocí kolonek SPE.

Pro metodu SPE byly testovány kolonky HLB, StrataX, WCX a kombinace kolonek SAX s HLB. Před nanesením 20 ml extraktu vzorku byla kolonka kondicionována. Po nanesení vzorku byla kolonka propláchnuta a sušena pod vakuem 45 minut. Kolistin byl poté eluován 10 ml roztoku do sběrné vialky. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku na vyhřívaném tělese a kolistin opětovně rozpuštěn v 1 ml rozpouštědla. Na obr 16 schematicky naznačen celý postup.



Obr 16: Schéma metody SPE (a), provedení s kolonkami HLB, StrataX, WCX (b) a kombinace dvou kolonek SAX→HLB (c)

Tab 6: Testované extrakční roztoky a metody SPE v první části

číslo metody	1 [45]	2	3	4 [46]	5	6 [47]	7
SPE kolonka	Oasis HLB	Oasis HLB	Oasis HLB	Oasis HLB	Oasis HLB	Oasis HLB	Oasis HLB
kondicionace	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	10 ml MeOH 5 ml H ₂ O 5 ml 0,2% HCOOH	3 ml MeOH 3 ml 0,04M EDTA	3 ml MeOH 3 ml CH ₃ COONH ₄ (pH 7)
nanesení vzorku (extrakční roztok)	20 ml (0,2% HCOOH)	20 ml (0,01M HCOOH)	250 a 400 ml [0,01M HCOOH/MeOH (50/50, v/v) - 20 ml extraktu naředěno kvůli MeOH]	20 ml (0,5M HCl)	25 ml [0,2% HCOOH/MeOH (95/5, v/v), úprava pH pomocí NaOH na 12,7]	20 ml (0,04M EDTA, McIlvainův pufr pH4)	20 ml (CH ₃ COONH ₄ pH 7)
proplach	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	2 ml H ₂ O	2 ml H ₂ O
sušení pod vakuem	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min
eluce	10 ml MeOH/H ₂ O/HCOOH (80/19/1, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	1,5 ml MeOH/H ₂ O/HCOOH (70/29,8/0,2, v/v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)
sušení pod N ₂	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C
číslo metody	8	9	10	11 [47]	12 [48]	13	
SPE kolonka	Oasis HLB	Oasis HLB	Oasis HLB + SAX	Oasis HLB + SAX	Oasis WCX	StrataX	
kondicionace	3 ml MeOH 3 ml CH ₃ COONH ₄ (pH 11)	5ml MeOH 5 ml H ₂ O 5 ml 0,01M HCOOH	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	3 ml MeOH 3 ml EDTA	2x 6 ml MeOH 6 ml H ₂ O 5 ml 20mM K ₂ HPO ₄	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	
nanesení vzorku (extrakční roztok)	20 ml (CH ₃ COONH ₄ pH 11)	400 ml [20 ml extraktu 0,01M HCOOH/ACN (50/50) naředěn vodou na 400 ml]	20 ml (0,01M HCOOH; 0,2% HCOOH)	20 ml (0,04M EDTA, McIlvainův pufr pH4)	20 ml (10% TCA, K ₂ HPO ₄ , NaOH)	20 ml (0,2% HCOOH)	
proplach	2 ml H ₂ O	2 ml H ₂ O	2 ml H ₂ O	2 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	bez proplachu	
sušení pod vakuem	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	
eluce	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 10% HCOOH/MeOH	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	
sušení pod N ₂	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	

3.7 Druhá část

Zásobní roztok kolistinu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven v 10% acetonitrilu. Další připravované roztoky byly ředěny 0,1% kyselinou mravenčí. Všechny roztoky byly uchovávány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Průběžně byl zásobní roztok opětovně připravován.

3.7.1 Optimalizace UPLC/MS/MS

Optimalizace metody pro UPLC/MS/MS probíhala se standardem kolistinu v 0,1% kyselině mravenčí o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ na koloně Luna Omega C18 (100x2,1 mm, 1,6 μm). Pro UPLC bylo optimalizováno složení mobilní fáze a její gradient. V hmotnostním spektrometru bylo postupně optimalizováno napětí na elektrospreji, teplota vyhřívání kapiláry a teplota zmlžovače. Použité parametry pro analýzu kolistinu na UPLC/MS/MS jsou uvedeny v tab 7. Díky trojitému kvadrupólu v hmotnostním spektrometru bylo možné sledovat kvantitativní a konfirmační hmotnostní přechody v MRM módu. Prvním krokem byl tedy sken produktových iontů z již známých iontů prekurzorových (tab 3) při různých hodnotách kolizní energie. Po optimalizaci kolizní energie byly vybrány konfirmační a kvantifikační hmotnostní přechody pro kolistin A a B. Pro přehled jsou sledované hmotnostní přechody uvedeny v tab 8.

Tab 7: Nastavení UPLC/MS/MS

Parametry UPLC			
Objem nástřiku	3 μl		
Teplota kolony	30 °C		
Průtok mobilní fáze	0,35 ml/min		
Složení mobilní fáze	A: 0,1% HCOOH		
	B: acetonitril		
Gradient mobilní fáze	t (min)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	4,5	50	50
	4,7	0	100
	6,5	0	100
	6,9	90	10
Post time	1,5 min		
Parametry MS/MS			
Iontový zdroj (polarita)	HESI (+)		
Napětí elektrospreje	4500 V		
Průtok pomocného plynu	20		
Teplota pomocného plynu	300 °C		
Průtok sušícího plynu	40		
Teplota sušícího plynu	350 °C		
Průtok zmlžovacího plynu	60		
Typ scanu	MRM		

Tab 8: Sledované hmotnostní přechody kolistinu A a B

		Prekurzor (m/z)	Produkt (m/z)	Kolizní energie (V)	Retenční čas (min)
Kolistin A	kvantifikační přechod	293	101,2	10	2,187
	konfirmační přechod	391	241,4	10	
Kolistin B	kvantifikační přechod	289,7	101,2	10	1,958
	konfirmační přechod	386	227,3	7,5	

3.7.2 Optimalizace extrakce a zakoncentrování kolistinu

Princip extrakce a přečištění na kolonkách SPE probíhal stejně jako v první části. Vyzkoušené metody jsou uvedené v tab 9. Modelové experimenty pro optimalizaci přípravy byly provedeny se vzorkem půdy před aplikací kolistinu. Pro testování extrakce a přečištění na kolonkách SPE bylo ke vzorkům přidáváno 10 µg nebo 100 µg kolistinu.

3.7.2.1 Obecný postup

2 g vysušené půdy (laboratorní teplota, 24 hod.) byly naváženy do extrakční zkumavky a případně přidán kolistin. Půda byla promíchána a ponechána 30 minut stát při laboratorní teplotě. K vzorku bylo přilito 10 ml extrakčního roztoku a směs byla 1 min promíchána na vortexu. Vzorek byl umístěn na 10 min do ultrazvukové lázně a následně do centrifugy (10 min, 4100 ot/min). Supernatant byl odlit do vialky a celý postup byl opakován. Byl tak získán extrakt o celkovém objemu 20 ml. Extrakt byl poté buď po přefiltrování přes 0,22 µm filtr přímo analyzován nebo byly extrakty s kolistinem přečištěny a zakoncentrovány pomocí kolonek SPE.

Pro metodu SPE byly testovány kolonky HLB a kombinace kolonek SAX s HLB (obr 16). Před nanesením 20 ml extraktu vzorku byla kolonka kondicionována. Po nanesení vzorku byla SPE kolonka propláchnuta a sušena pod vakuem 45 minut. Kolistin byl poté eluován 10 ml roztoku do sběrné vialky. Eluát byl odpařen pomocí proudu dusíku na vyhřívaném tělese, kolistin bylo poté opětovně rozpuštěn v 1 ml roztoku 10% MeOH/0,1% HCOOH. Vzorek byl přefiltrován do vialky přes 0,22 µm filtr.

3.7.3 Matriční efekt

Pro testování vlivu matrice na stanovení kolistinu v UPLC/MS/MS byly připraveny samotné extrakty půdy (bez kolistinu). Poté k nim bylo přidáno známé množství kolistinu a byl sledován rozdíl v intenzitě signálu bez a za přítomnosti matrice.

3.7.4 Optimalizace extrakčního rozpouštědla

K 1 g půdy bylo přidáno známé množství kolistinu (0,1 mg, 1 mg, 10 mg a 50 mg). Po 30 min bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku a směs byla promíchána na vortexu (1 min). Následně proběhla extrakce v ultrazvukové lázni (10 min) s následovanou centrifugací (10 min, 4100 ot/min). Po odlití supernatantu byla extrakce opakována. Ze získaného celkového objemu 10 ml extraktu byl odebrán 1 ml, přefiltrován přes 0,22 µm filtr do vialky a analyzován.

3.7.5 Experiment s prasečí kejdou

Prasečí kejda byla rozmražena a přefiltrována pomocí vakuové filtrace. 20 ml filtrátu bylo obohaceno o 10 µg kolistinu a upraveno pomocí 30% NaOH na pH 9. Poté proběhla extrakce na kolonkách SPE. Testované postupy jsou uvedené v tab 9, přičemž se jedná o metody čísla 9, 10 a 11.

Tab 9: Testované extrakční roztoky a metody SPE v druhé části

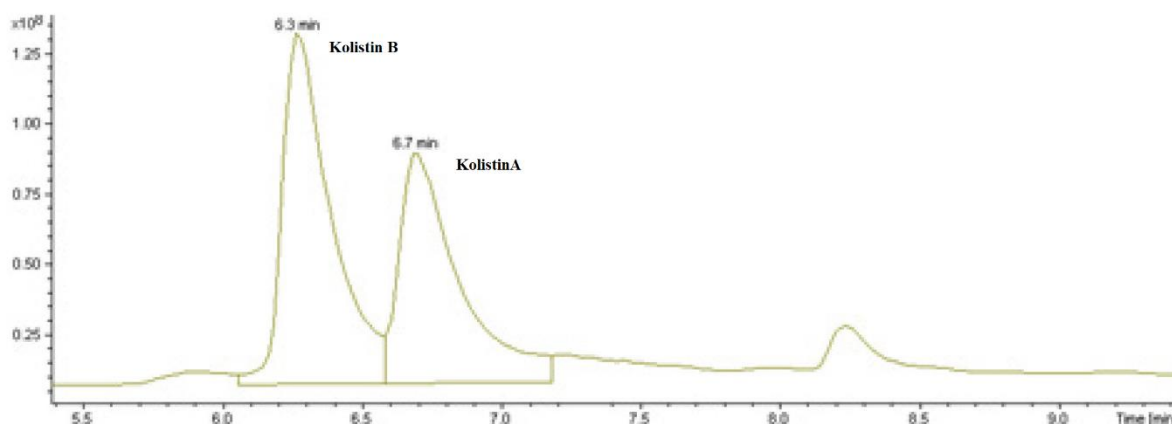
číslo metody	1	2	3	4	5	6
SPE kolonka	Oasis HLB	SAX + Oasis HLB	Oasis HLB	SAX + Oasis HLB	Oasis HLB	SAX + Oasis HLB
kondicionace	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	5 ml MeOH 5 ml CH ₃ COONH ₄ (pH 7)	5 ml MeOH 5 ml CH ₃ COONH ₄ (pH 7)	5 ml MeOH 5 ml 0,04M EDTA, McIlvainův pufr pH 4	5 ml MeOH 5 ml 0,04M EDTA, McIlvainův pufr pH 4
nanesení vzorku (extrakční roztok)	20 ml (0,1% HCOOH)	20 ml (0,1% HCOOH)	20 ml (CH ₃ COONH ₄ pH 7)	20 ml (CH ₃ COONH ₄ pH 7)	20 ml (0,04M EDTA, McIlvainův pufr pH 4)	20 ml (0,04M EDTA, McIlvainův pufr pH 4)
proplach	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O
sušení pod vakuem	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min
eluce	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)
sušení pod N ₂	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C
číslo metody	7	8	9	10	11	12
SPE kolonka	Oasis HLB	SAX + Oasis HLB	Oasis HLB	Oasis HLB	Oasis WCX	Oasis WCX
kondicionace	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	5 ml MeOH 5 ml H ₂ O	5 ml MeOH 5 ml CH ₃ COONH ₄ (pH 7)	3 ml MeOH 3 ml H ₂ O	3 ml MeOH 3 ml H ₂ O
nanesení vzorku (extrakční roztok)	20 ml (5% MeOH/0,1% HCOOH)	20 ml (5% MeOH/0,1% HCOOH)	20 ml kejdy	20 ml kejdy	20 ml kejdy (pH upraveno na 9)	20 ml [10% TCA/ACN (4/6, v/v)]
proplach	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	3 ml H ₂ O, 3 ml MeOH, 3 ml 5% HCOOH	3 ml H ₂ O, 3 ml MeOH, 3 ml 5% HCOOH
sušení pod vakuem	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min
eluce	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 0,2% HCOOH/MeOH (30/70, v/v)	10 ml 20% HCOOH/MeOH	10 ml 20% HCOOH/MeOH
sušení pod N ₂	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C	3–4 hod, 40 °C

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 První část

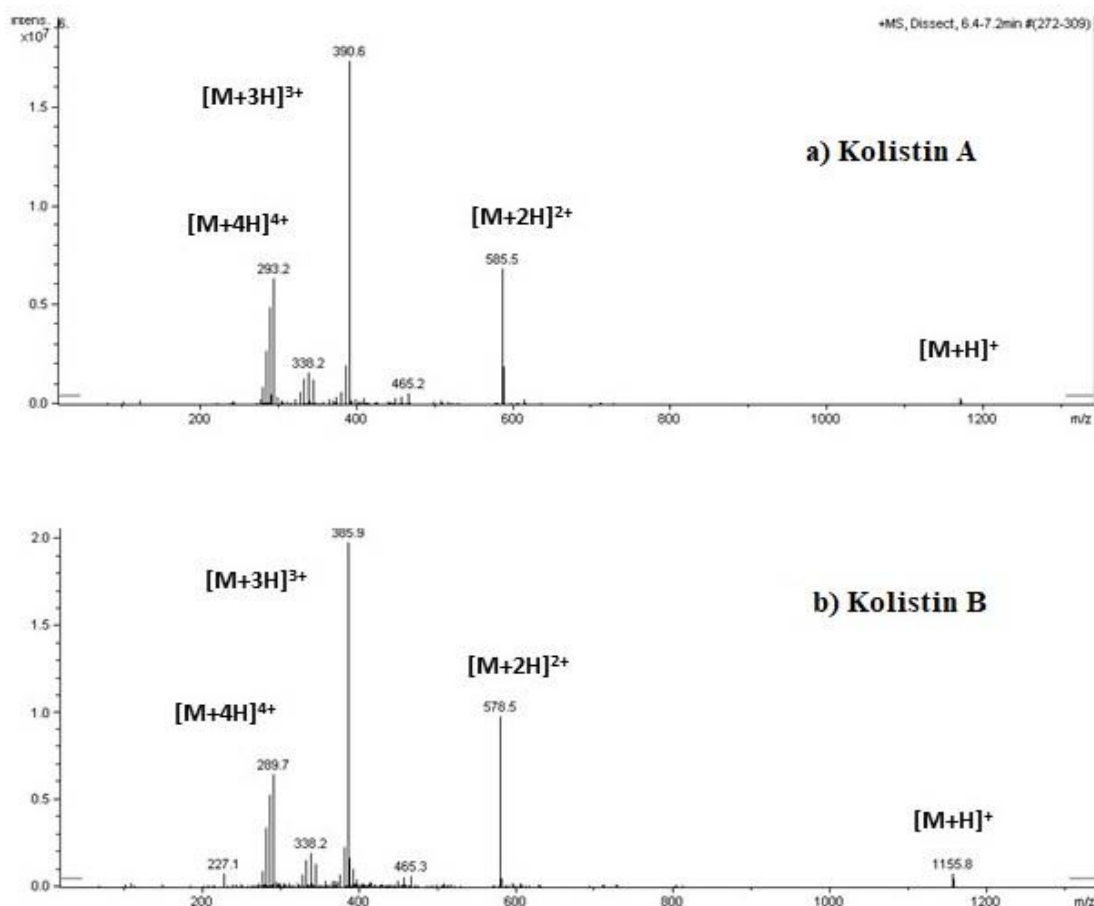
4.1.1 Optimalizace HPLC/MS

Na obr 17 lze vidět chromatogram po optimalizaci HPLC/MS. Pro identifikaci píků byly využity zvlášť standardy kolistinu A a kolistinu B. Jako první byl eluován kolistin B při retenčním čase 6,3 min, a následně byl eluován kolistin A při retenčním čase 6,7 min. Celkový čas analýzy byl 20 min.



Obr 17: Chromatogram (TIC) standardu kolistinu (1 µg/ml)

V použitém přístroji HPLC/MS s iontovou pastí nebylo možné využít sledování hmotnostních přechodů iontů prekurzor/produkt, tudíž bylo snímáno pouze hmotnostní spektrum v rozsahu hmot m/z 50–650. Jak je vidět na obr 18 největší intenzity dosahovaly trojnásobně nabitě molekuly kolistinu, tudíž byly zvoleny jako kvantifikační ionty. Jako konfirmační ionty byly zvoleny dvojnásobně a čtyřnásobně nabitě ionty. Jednou nabitě ionty nebyly brány v úvahu, jelikož byly nejméně intenzivní.



Obr 18: Hmotnostní spektrum kolistinu A (a) a kolistinu B (b)

4.1.2 Optimalizace extrakce a zakoncentrování kolistinu

Jako výchozí extrakční roztoky byly zvoleny: methanol/0,01M HCOOH (1/1, v/v), čistý methanol, čistá MQ voda, 0,2% HCOOH a 0,01M HCOOH. Pro první testy přechištění a zakoncentrování byly vybrány kolony HLB, jelikož se nejčastěji používají při analýze kolistinu v biologických vzorcích. Pokud byl kolistin přidán do čistého extrakčního roztoku a zakoncentrován na SPE kolonkách, tak byl následně detekován na HPLC/MS. Nejvyšší výtěžnosti (72 %) bylo dosaženo při použití 0,2% kyseliny mravenčí. Pro testování vlivu matrice na detekci kolistinu v HPLC/MS byly také připraveny extrakty půdy, které byly následně obohaceny kolistinem. Následně byly porovnávány intenzity kvantifikačních iontů s čistými extrakčními roztoky obsahující stejné množství kolistinu. Při použití extraktů půdy obsahující kyselinu mravenčí byla snížena intenzita signálu o 35–40 % oproti čistým extrakčním roztokům. Naproti tomu v čisté vodě došlo k navýšení signálu. Z toho plyne, že extrakční roztoky mají velký vliv na extrahování matrice a může tak docházet k různým matričním efektům (snížení nebo zvýšení signálu). Bylo tedy rozhodnuto, že po zvolení vhodného postupu extrakce se bude připravovat kalibrační řada v extraktu půdy, aby nedocházelo k nadhodnocování či podhodnocování výsledků.

V dalším kroku byly modelové vzorky půdy obohacené o kolistin podrobeny extrakcím a zakoncentrováním na kolonkách SPE s HLB stacionární fází na základě postupů z literatury

(tab 6). K vzorkům půdy byl zpočátku přidáván 1 µg kolistinu, který byl po optimalizaci HPLC/MS vždy detekován. Po žádném z testovaných postupů extrakce půdy se však nepodařilo přidáný kolistin detekovat. Jelikož bylo v předchozím kroku zjištěno, že může docházet vlivem matrice ke snížení intenzity stanovovaného kolistinu v HPLC/MS, byl proto navýšen jeho přídavek na 10 µg a následně i na 100 µg. I přesto se nepodařilo kolistin detekovat.

Kvůli možné interakci kladně nabitého kolistinu se záporně nabitými huminovými látkami obsaženými v půdě, bylo vyzkoušeno také dvojnásobné přechištění na SPE kolonkách. Nejdříve byl extrakt půdy s kolistinem čištěn na SPE kolonce s anionaktivním iontoměničem (SAX), a následně na kolonce s HLB fází. Předpokládalo se, že pokud se nejdříve zachytí organické kyseliny na aniontoměniči, tak dojde k účinnějšímu zachycení a eluci kolistinu na kolonkách s HLB fází a matriční efekt huminových kyselin bude tak výrazně nižší. Bohužel, ani po těchto postupech nebyl kolistin stále detekován.

Jako poslední byla vyzkoušena SPE kolonka s navázanou alifatickou karboxylovou skupinou na silikagelu (Oasis WCX). Jelikož je v tomto případě stacionární fázi slabý kationtoměnič, předpokládalo, že by se tak kladně nabitý kolistin byl schopný zachytit a následně eluovat. Nicméně ani po tomto postupu nebyl kolistin v eluátu detekován.

Z výše uvedených postupů nebylo možné vybrat metodu, pomocí které by bylo možné kolistin v modelových experimentech z půdy extrahovat a detekovat. Přesto bylo přistoupeno k extrakci vzorků půdy z pokusného pole (3.5) a vzorky půdy byly po extrakci analyzovány bez jakékoliv další úpravy. Rezidua kolistinu nebyla v těchto vzorcích nalezena. Z tohoto výsledku není ovšem možné usoudit, že kolistin se v půdě nenacházel.

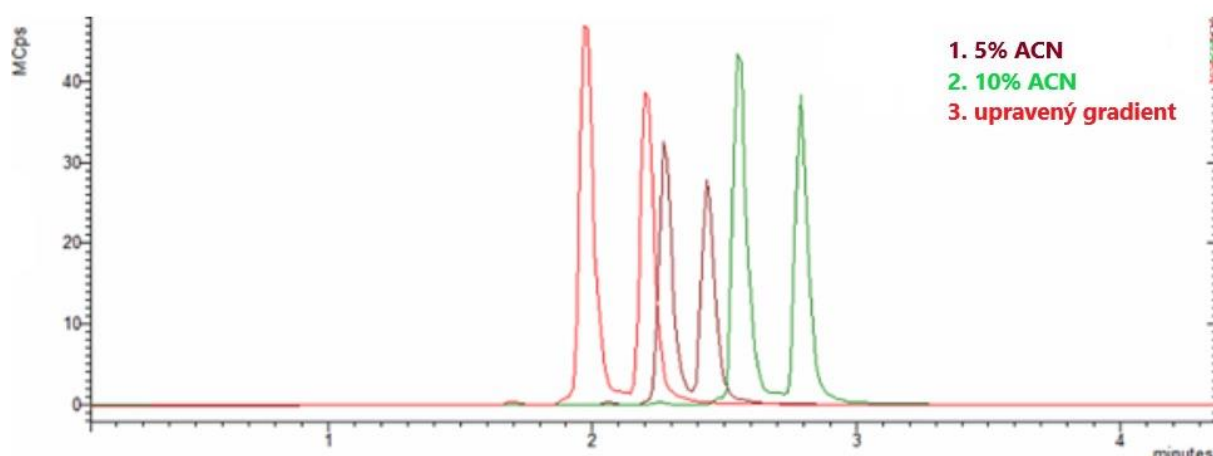
4.2 Druhá část

Kvůli současné situaci ve světě a nařízením vydaných v České republice v souvislosti s pandemií nebylo možné kontinuálně pracovat na experimentální části diplomové práce. Po půlročním přerušení se začalo pracovat na hledání extrakční metody od začátku, jelikož v první fázi experimentální práce nebyl vybrán žádný vhodný postup k izolaci kolistinu z půdy. K detekci kolistinu byl také využíván nový přístroj UPLC/MS/MS s trojitým kvadrupólem, který byl fakultou zakoupen. I když musela být vytvořena a optimalizována nová metoda pro detekci kolistinu, jeho nespornou výhodou se stala rychlejší analýza a hlavně možnost měřit v citlivějším MRM módu. Díky tomu mohly být sledovány typické hmotnostní přechody kolistinu prekurzor/produkt.

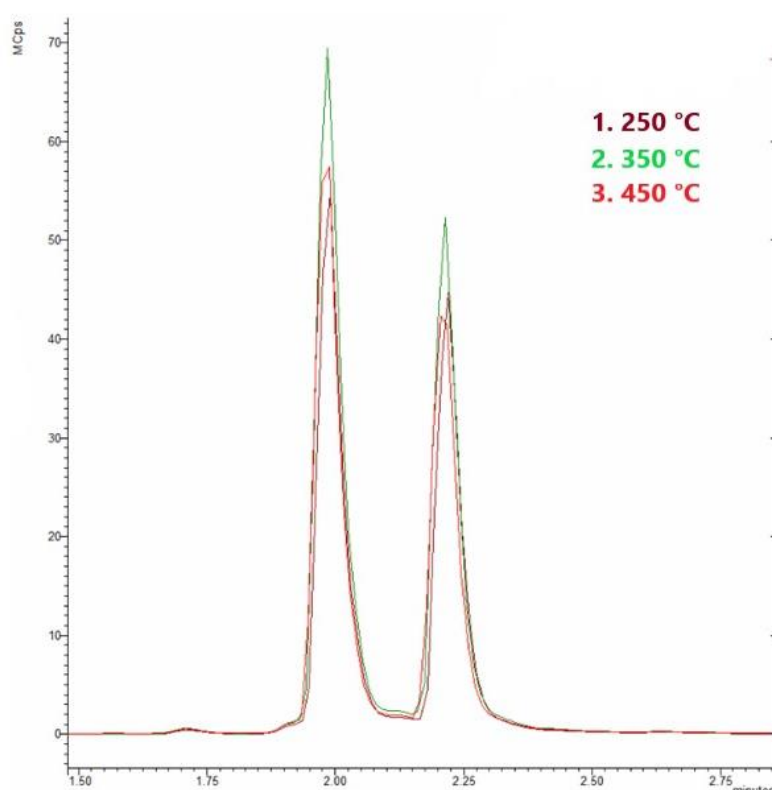
4.2.1 Optimalizace UPLC/MS/MS

Prvním krokem při optimalizaci byla úprava složení mobilní fáze a jejího gradientu. Při prvním nastavení obsahovala mobilní fáze 5 % acetonitrilu na počátku gradientu. Po úpravě mobilní fáze na 10 % acetonitrilu došlo k lepšímu rozlišení píků a zvýšila se také jejich intenzita. Po změně gradientu (začátek na 10 % acetonitrilu) bylo dosaženo dřívější eluce kolistinu. Porovnání jednotlivých nastavení je vidět na obr 19. Následně bylo optimalizováno napětí na kapiláře elektrospreje. Nejvyšších intenzit píků bylo dosaženo při napětí 4500 V a 5000 V, přičemž nakonec bylo zvoleno napětí 4500 V, jelikož 5000 V bylo hraniční nastavitelnou hodnotou přístroje. Teplota pro vyhřívání kapiláry elektrospreje byla ponechána při 300 °C,

protože při jiných hodnotách došlo opět ke zhoršení rozlišení a tvaru píků. Jako poslední byla v části UPLC optimalizována teplota zmlžovače. Na obr 20 jde vidět, že při 350 °C byla intenzita nevyšší, kdežto pokud se teplota zvýšila či snížila došlo ke snížení intenzity píků. Po ukončení optimalizace UPLC byl kolistin B eluován při retenčním čase 1,995 min a při retenčním čase 2,212 min byl eluován kolistin A. Celková doba jedné analýzy i s post time fází byla 7,4 min, což je v porovnání s předchozí analýzou u HPLC/MS zkrácení o více než polovinu času, a tím i snížení celkové spotřeby mobilních fází.

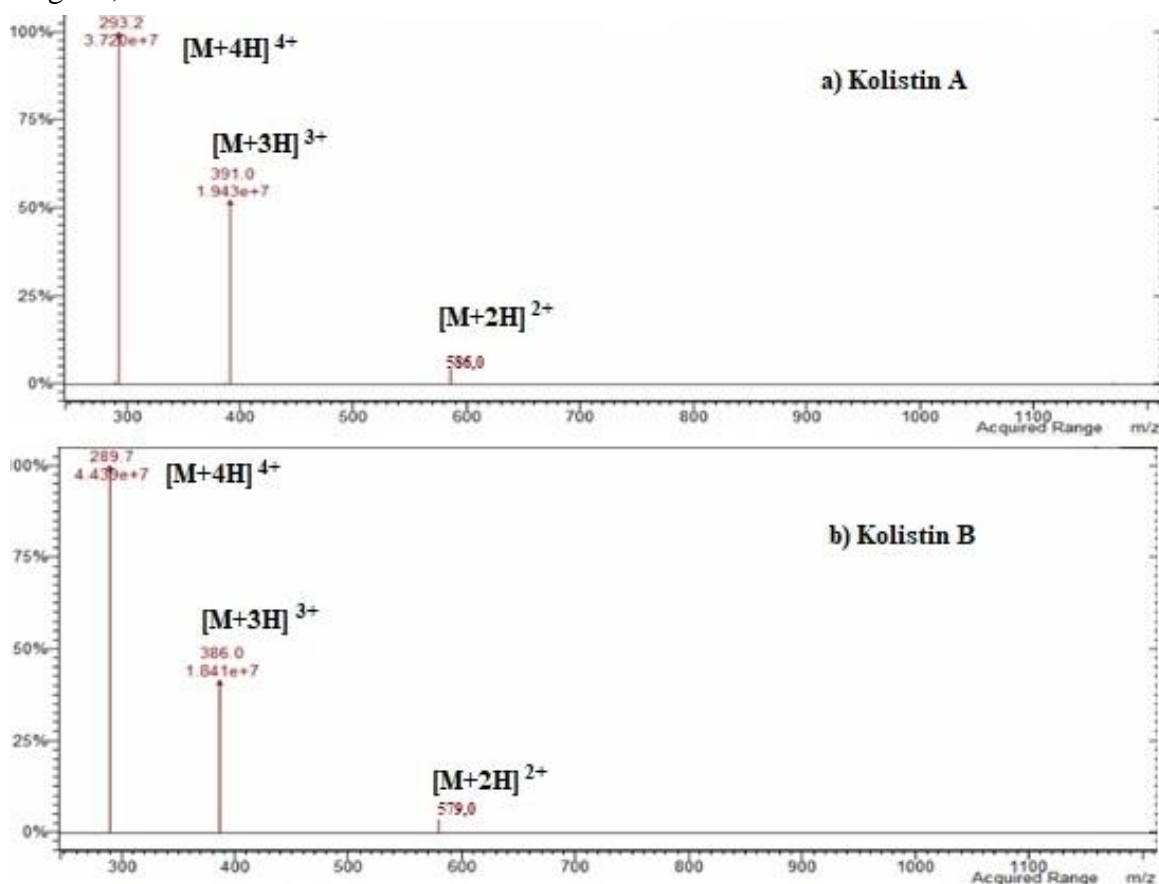


Obr 19: Optimalizace mobilní fáze a gradientu (UPLC)



Obr 20: Optimalizace teploty zmlžovače

Při optimalizaci nastavení hmotnostního spektrometru byly vybírány prekurzorové ionty s nejvyšší intenzitou, které se následně fragmentovaly a byly skenovány jejich produktové ionty. Dvojnásobně nabitě molekuly byly málo intenzivní a jednou nabitě molekuly se nevyskytovali ve spektru vůbec, a proto se dále nesledovaly. Nejintenzivnější hmoty m/z měly trojnásobně a čtyřnásobně nabitě molekuly kolistinu, jak je vidět na obr 21. Proto byly vybrány pro následnou fragmentaci. Pro fragmentace byly testovány různé kolizní energie. U čtyřnásobně i trojnásobně nabitěho prekurzoru kolistinu A bylo dosaženo nejlepší fragmentace při 10 V. Při jiných hodnotách kolizní energie buď nedošlo vůbec k fragmentaci, anebo byla fragmentace až příliš rozsáhlá, což je v obou případech nežádoucí jev, který zhoršuje kvantifikaci. V případě kolistinu B byla pro fragmentaci čtyřnásobně nabitě molekuly vybrána kolizní energie taktéž 10 V, ale v případě trojnásobně nabitě molekuly byla zvolena kolizní energie 7,5 V.



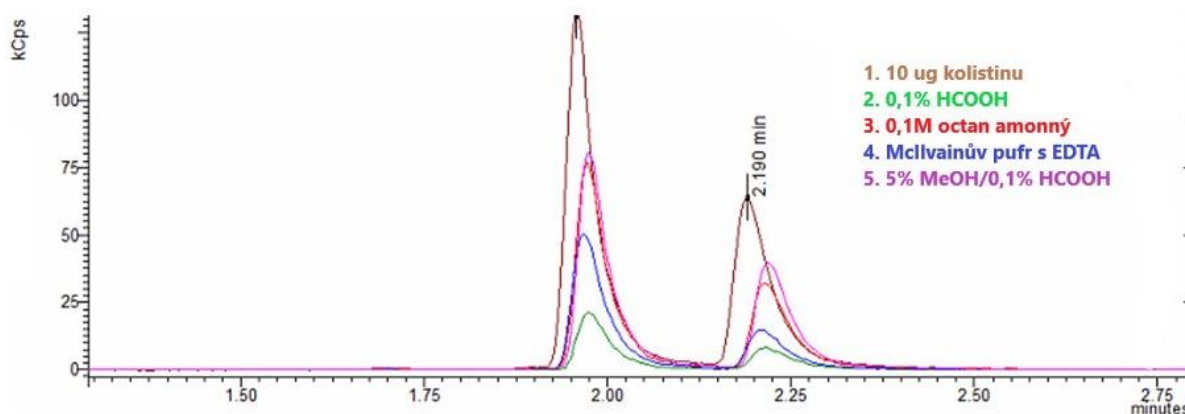
Obr 21: Hmotnostní sken prekurzorů kolistinu A (a) a kolistinu B (b)

4.2.2 Optimalizace extrakce a zakoncentrování kolistinu

Pro první testy extrakce kolistinu byly zvoleny samotné extrakční roztoky s prostředím o různém pH (obohacené o 10 μg kolistinu) a přečištěním na kolonkách Oasis HLB a s dvojnásobným přečištěním na kolonkách SAX s Oasis HLB (kvůli možné interakci huminových kyselin z extraktu s kolistinem). Paralelně byly provedeny extrakce půd obohacených o 10 μg kolistinu stejnými extrakčními roztoky a s následným přečištěním na SPE kolonkách. Prvním testovaným extrakčním roztokem byla 0,1% kyselina mravenčí,

která zajistila kyselé prostředí (pH 3) a tudíž kladně nabitý kolistin. Jako další extrakční roztok byl zvolen octan amonný, který zajistil neutrální prostředí (pH 7), ve kterém se také nachází kladně nabitý kolistin. Třetím extrakčním roztokem byl anorganický McIlvainův pufr s EDTA (pH 4), který se používá pro extrakci jiných antibiotik [49]. Posledním testovaným roztokem byl 5% MeOH/0,1% HCOOH, který testoval vliv přidaného organického rozpouštědla do extrakčního roztoku 0,1% HCOOH. Pro stanovení vlivu matrice na analýzu byly připraveny také samotné extrakty půd danými roztoky, které byly obohaceny kolistinem až dodatečně.

V případě, kdy bylo do čistých extrakčních roztoků přidáno 10 µg kolistinu a celé směsi byly podrobeny přečištění na SPE kolonkách, byl kolistin pomocí UPLC/MS/MS detekován. Intenzity signálů byly nižší oproti porovnávanému standardu kolistinu o koncentraci 10 µg/ml jak je vidět na obr 22. I když nejvyšších signálů (nejvyšší výtěžnosti) dosahovaly extrakční roztoky octanu amonného a 5% MeOH/0,1% HCOOH (tab 10), tak po extrakcích půdy obsahující přidaný kolistin a přečištění na SPE kolonkách, nebyl kolistin detekován ani v jednom případě. Taktéž použití kolonek SAX pro přečištění a snížení vlivu organických kyselin z extraktů půd nebylo účinné, a kolistin nebyl detekován.



Obr 22: Porovnání chromatogramů extrakčních roztoků (obohacenými o 10 µg) přečištěnými na kolonkách Oasis HLB se standardem kolistinu (10 µg/ml)

Tab 10: Účinnost přečištění extrakčních roztoků na kolonce Oasis HLB

Extrakční roztok	Účinnost kolonek Oasis HLB (%)
0,1% HCOOH	12
0,1M octan amonný	43
McIlvainův pufr s EDTA	26
5% MeOH/0,1% HCOOH	46

Jako poslední byla testována extrakce 2 g půd obohacených o 100 µg kolistinu. Ze získaného 20 ml extraktu byl odebrán 1 ml (teoreticky obsahující 5 µg kolistinu), který byl přímo analyzován na UPLC/MS/MS. Ani v tomto případě nebyl kolistin detekován.

Jedním z důvodů neúspěchů extrakce a detekce kolistinu by mohlo být například vytváření komplexů s huminovými látkami. Jelikož je kolistin několikanásobně kladně nabitý v širokém rozmezí pH, tak by mohl teoreticky vytvářet silné vazby se záporně nabitými funkčními skupinami huminových látek (karboxylové a fenolové skupiny). Druhou možností by mohl být silný matriční efekt, protože půda obsahuje velice pestrou škálu chemických látek

a do extrakčních roztoků se tak vyextrahovávají spolu s kolistinem i další látky. Ty pak mohou způsobovat značné snížení signálu při ionizaci. Kolistin jakožto polární látka má značně nízkou hodnotu logP (-3,3 [54]), a proto by se dalo předpokládat, že je velice dostupný v půdním roztoku a bude se také snadno extrahovat. Nicméně v půdě hraje důležitou roli také distribuční koeficient K_d stanovovaný pro systém voda-půda, který nám říká, jestli se látka bude spíše sorbovat na půdní organickou hmotu nebo bude přítomná spíše v půdním roztoku. Touto problematikou kolistinu se značně zabývali teprve ve studii [50] publikované v roce 2020, ve které byla tato hodnota experimentálně stanovována. Experimenty probíhaly na dvou standardizovaných půdách o rozdílných hodnotách pH, obsahu organického uhlíku, kationtové výměnné kapacity a o rozdílné struktuře. U kolistinu byla pozorována tak silná sorpce, že nebylo možné kolistin kvantitativně extrahovat z půdy žádným použitým roztokem. Pro půdu LUFA 2.1 byly distribuční koeficienty určeny pouze za použití jednoho bodu z izotermy, který byl získán až po obohacení nejvyšší koncentrací kolistinu. Pro kolistin A byla v tomto případě stanovena hodnota K_d na 111, a pro kolistin B na 256. Minimální hodnoty K_d v půdě LUFA 6S byla odhadnuta na základě limitu kvantifikace. Pro kolistin A je hodnota K_d větší než 52, a pro kolistin B je větší než 185.

4.2.3 Optimalizace extrakčního roztoku

Kvůli skutečnosti, že se nepodařilo detekovat kolistin po žádném z výše uvedeném postupu extrakce a přečištění, bylo rozhodnuto vyzkoušet jen samotné extrakce půd obohacené kolistinem s přímou analýzou na UPLC/MS/MS. První pokusy probíhaly s 1 g půdy, která byla obohacena o 100 μg kolistinu a s pěti různými extrakčními roztoky (H_2O , 0,1% HCOOH , 10% MeOH /0,1% HCOOH , 2% HCOOH , 10% MeOH /2% HCOOH , 15% MeOH /2% HCOOH). Roztoky s 0,1% HCOOH byly zvoleny, protože v předchozích experimentech měli dobré výsledky, co se týče intenzity píků při testování matričních efektů. Roztoky s 2% HCOOH byly zvoleny jednak z důvodu otestování vyšší koncentrace kyseliny mravenčí (zda bude rozdíl oproti 0,1% HCOOH), a také protože byla v kombinaci s methanolem použita k extrakci kolistinu z krmiva (tedy z pevné fáze, jako je půda) [55]. Současně byly pro sledování matričních efektů připraveny také extrakty půd, do nichž byl posléze přidán 1 μg kolistinu, a samotné extrakční roztoky s 1 μg kolistinu.

Ani v jednom případě nebyla extrakce přidaného kolistinu účinná. Nicméně bylo zjištěno, že při použití roztoků s 2% kyselinou mravenčí nedochází k matričním efektům na rozdíl od ostatních roztoků (tab 11). Pro další experiment byl vybrán extrakční roztok 10% MeOH /2% HCOOH vzhledem k mobilní fázi, která na začátku gradientu obsahuje 10 % acetonitrilu.

Tab 11: Vliv složení extrakčního roztoku na matriční efekt extraktu při detekci v UPLC/MS/MS

Extrakční roztok	Matriční efekt (%)
H ₂ O	36
0,1% HCOOH	61
10% MeOH/0,1% HCOOH	82
2% HCOOH	101
10% MeOH/2% HCOOH	98
15% MeOH/2% HCOOH	110

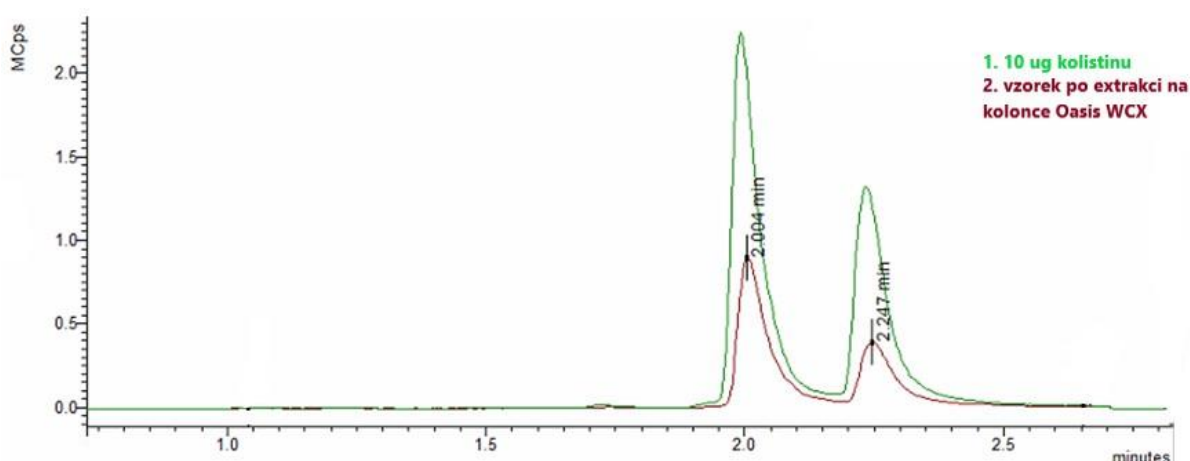
Další experimenty extrakce byly provedeny s 2 g půdy obohacené o 0,1 mg, 1 mg, 10 mg a 50 mg kolistinu, přičemž byl použit jako extrakční roztok výše zmíněný 10% MeOH/2% HCOOH. V tomto případě bylo spíše testováno, kolik kolistinu je půda schopná nasorbovat. Po extrakci byl odebrán vždy 1 ml roztoku a přímo analyzován. Ani v jednom případě nebyl kolistin detekován, z čehož se dá předpokládat, že opravdu silně interaguje s půdní maticí.

4.2.4 Experiment s prasečí kejdou

Pro otestování jiné matrice, byla využita prasečí kejda, která byla aplikována na testovanou půdu. K 20 ml přefiltrované kejdy bylo přidáno 10 µg kolistinu a byly provedeny tři různé přechištění na SPE kolonkách.

První postup na kolonkách Oasis HLB zahrnoval klasickou kondicionace methanolem a vodou. Druhý postup zahrnoval kondicionace methanolem a octanem amonným, u kterého byla v dřívějším experimentu zaznamenána poměrně vysoká výtěžnost po přechištění čistého extrakčního roztoku obohaceného o kolistin. V těchto případech nebyl kolistin opět detekovat.

Třetí experiment probíhal na kolonce Oasis WCX podle nastudovaného článku [38], který se zabýval přímo extrakcí a analýzou kolistinu v kejdě, hnoji a krmivu. Tento postup zahrnující (v případě kejdy) pouze úpravu pH na 9 a přechištění na kolonce Oasis WCX byl úspěšný. V porovnání se vzorkem pro matriční efekt byla nicméně snížena intenzita na 35 %. Porovnání píků je zobrazeno na obr 23. Následně byla vyzkoušena také extrakce s půdou, kdy stejně jako v článku [38], byl použit pro extrakci kolistinu z pevné matrice hnoje a krmiva roztok 10% TCA/ACN (40/60, v/v). Postup v článku zahrnoval pouze míchání na vortexu a centrifugaci bez přechozího ultrazvuku. Jelikož byla ale testována půda, byl vyzkoušen také postup zahrnující extrakci ultrazvukem. Hodnoty pH získaných extraktů byly upraveny na 9 a poté nanášeny na kolonky Oasis WCX. Bohužel, v případě půdy se kolistin o pět nepodařilo vyextrahovat.

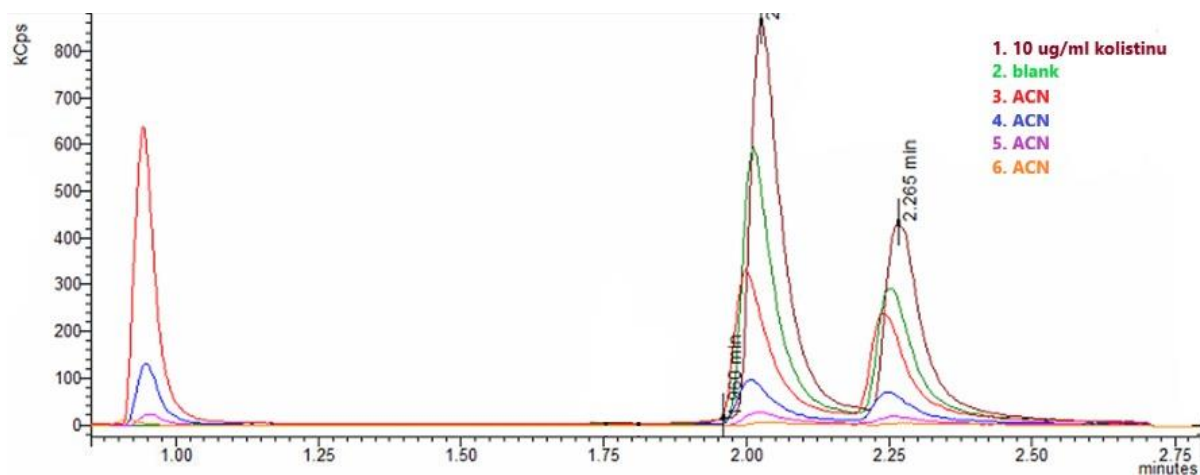


Obr 23: Porovnání chromatogramu prasečí kejdy přečištěné na kolonce Oasis WCX se vzorkem pro matriční efekt

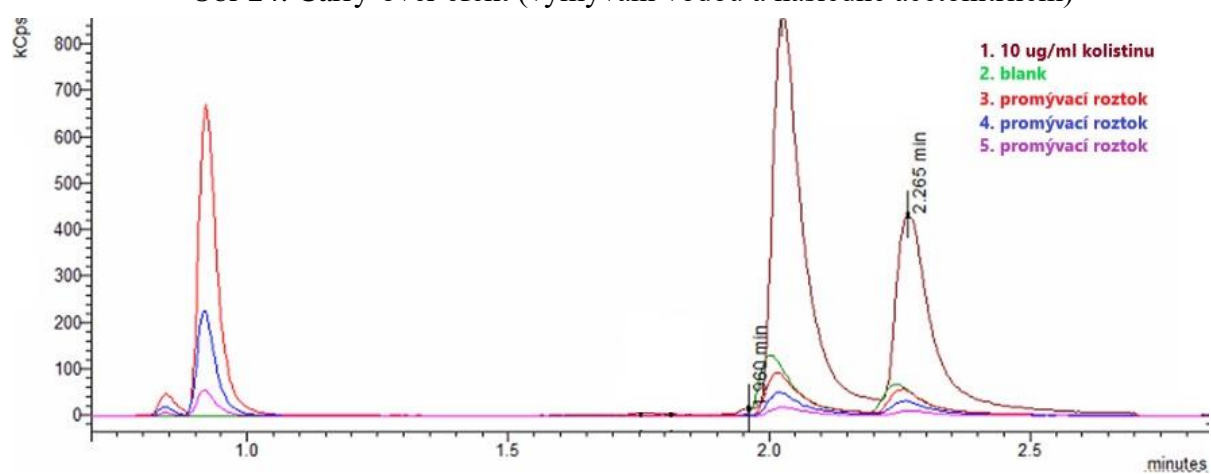
4.2.5 Carry-over efekt

Carry-over efekt, je termín, který se používá k popisu kontaminace, která způsobuje výskyt sledovaných píků v dalších nástřicích (např. blanků), které sledovanou látku ve skutečnosti neobsahují. Pozorované píky se mohou objevovat i po několika sobě jdoucích nástřicích blanků, přičemž se postupně snižuje intenzita píků tím, jak se množství kontaminace s každým nástřikem snižuje. Tento problém byl upozorován při poslední sekvenci měření, při které byly analyzovány vzorky obsahující vyšší koncentrace kolistinu.

Pro ověření carry-over efektu byl nástříknut vzorek kolistinu a následně dvakrát po sobě dva blanky s (MQ H₂O). Hodnoty intenzit blanků dosahovali 70 % a 67 % intenzity předchozího vzorku. Po nástříknutí čistého acetonitrilu [56] došlo k objevení píku v mrtvém retenčním čase. Po opakovaném nástřikování čistého acetonitrilu postupně docházelo ke snižování intenzity píku v mrtvém čase, až do jeho vymizení (obr 24). Po dalším nástříknutí vzorku kolistinu a následně čistého blanku, se v něm opět objevily intenzivní píky. Podle jedné studie [57] byl vyzkoušen promývací roztok obsahující ACN/MQ/HCOOH (90/8/2, v/v/v), který byl použit k eliminaci carry-over efektu po nástřicích vyšších koncentrací kolistinu ve vzorcích plazmy a moči. Na obr 25 jde vidět porovnání chromatogramů po nástřicích tohoto roztoku a jak se snižuje jejich intenzita. K úplnému odstranění kontaminace systému bylo potřeba více nástřiků promývacího roztoku. Po zapnutí funkce automatického oplachu jehly (promývacím roztokem) kontaminace vymizela.



Obr 24: Carry-over efekt (vymývání vodou a následně acetonitrilem)



Obr 25: Carry-over efekt (promývací roztok ACN/MQ/HCOOH)

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat extrakční a analytickou metodu pro stanovení kolistinu v půdě a následně otestovat vybraný postup na sadě reálných vzorků. Literatura zabývající se extrakcí kolistinu z půdy není dostupná, a proto se vycházelo při vytváření testovaných postupů z publikovaných zdrojů, které se zabývají extrakcí kolistinu z biologických vzorků, hnoje a kejdy.

Analytická metoda pro detekci kolistinu byla úspěšně vytvořena nejen pro kapalinový chromatograf s hmotnostní spektrometrií obsahující iontovou past, ale také pro systém, v němž byl použit jako analyzátor trojitý kvadrupól. Bylo provedeno několik postupů extrakce z dostupné literatury a také jejich různé obměny zahrnující vortex, ultrazvukovou lázeň, centrifugaci, extrakci tuhou fází (SPE) či srážení. Také byly vyzkoušeny přímé nástřiky extraktů půdy, do kterých bylo před extrakcí ultrazvukem přidáno známé množství kolistinu. Z půdy se nepodařilo kolistin vyextrahovat žádným testovaným způsobem. Kolistin byl úspěšně detekován pouze v extraktu z kejdy.

Důvodů, proč kolistin v extraktech z půdy nebyl detekován, může být několik. Pokud byl kolistin vyextrahován, mohl vytvářet komplexy s huminovými látkami přítomnými v extraktu. Tyto komplexy mají různé neznámé molární hmotnosti, které tak nebylo možné detekovat. Dalším důvodem mohl být vliv matričního efektu. Nicméně ve většině testovaných postupů nebyl tento vliv tak velký, aby způsobil, že kolistin nebude detekován. Kolistin se také může silně vázat na půdní organickou hmotu tak, že jej není možné vyextrahovat. Silnou sorpci kolistinu na půdní organickou hmotu naznačují i jeho vysoké distribuční koeficienty K_d . Na jednu stranu je pozitivní, že se kolistin snadno nešíří do dalších složek životního prostředí a nekontaminuje je. Na druhou stranu kolistin vykazuje perzistentní chování, které je nebezpečné nejen z hlediska ekotoxicity pro půdní organismy a rostliny, ale také z hlediska možného vzniku a šíření rezistence bakterií.

V případě dalších prací zabývajících se detekcí kolistinu v půdní matici bude vytvoření a optimalizace jeho extrakce klíčové. Také by bylo vhodné, aby byly případné kalibrační řady připravovány z extraktů půd, které byly podrobeny stejnému postupu extrakce jako vzorek. Tímto způsobem by se zabránilo k nadhodnocování či podhodnocování získaných výsledků.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GOVIL, Deepak, Sachin GUPTA, Ashima MALHOTRA, Prem N. KAKAR, Deep ARORA, Shibani DAS a Pradeep GOVIL. Colistin and polymyxin B: A re-emergence. *Indian Journal of Critical Care Medicine* [online]. 2009, **13**(2), 49-53 [cit. 2020-09-29]. ISSN 0972-5229. Dostupné z: doi:10.4103/0972-5229.56048
- [2] NEAGU, Maria, Cristina MARINESCU a Carmen POPESCU. The validation of the analytical method (HPLC), use for identification and assay of the pharmaceutical active ingredient, colistine sulphate and the finished product Colidem 50 – hydrosoluble powder, in SC DELOS impex '96 SRL. *Medicamentul Veterinar* [online]. 2011, **5**(1), 41-63 [cit. 2020-09-29]. ISSN 2069-2463. Dostupné z: <https://journals.indexcopernicus.com/search/article?articleId=535818>
- [3] QI, Bing, Matthias GIJSEN, Pieter VAN BRANTEGEM, et al. Quantitative determination of colistin A/B and colistin methanesulfonate in biological samples using hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis* [online]. 2020, **12**(8), 1183-1195 [cit. 2020-09-29]. ISSN 1942-7603. Dostupné z: doi:10.1002/dta.2812
- [4] *Český lékopis*. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [5] PACHECO, Tatiana, Rosa-Helena BUSTOS, Diana GONZÁLEZ, Vivian GARZÓN, Julio-Cesar GARCÍA a Daniela RAMÍREZ. An Approach to Measuring Colistin Plasma Levels Regarding the Treatment of Multidrug-Resistant Bacterial Infection. *Antibiotics* [online]. 2019, **8**(3) [cit. 2020-09-29]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics8030100
- [6] CATRY, Boudewijn, Marco CAVALERI, Keith BAPTISTE, et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA). *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2015, **46**(3), 297-306 [cit. 2020-09-30]. ISSN 0924-8579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005
- [7] Polymyxiny (kolistin a CMS) – ukončeno celoevropské přehodnocení. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, c2010 [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/polymyxiny-kolistin-a-cms-ukonceno-celoevropske-prehodnoceni>
- [8] LI, Jian, Roger L. NATION, Robert W. MILNE, John D. TURNIDGE a Kingsley COULTHARD. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2005, **25**(1), 11-25 [cit. 2020-12-04]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.10.001
- [9] FALAGAS, M. E., S. K. KASIAKOU a L. D. SARAVOLATZ. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2005, **40**(9), 1333-1341 [cit. 2020-10-01]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/429323
- [10] RASTOGI, N., M.-C. POTAR a H.L. DAVID. Antimycobacterial spectrum of colistin (polymixin E). *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* [online]. 1986, **137**(1), 45-53 [cit. 2020-10-01]. ISSN 0769-2609. Dostupné z: doi:10.1016/S0769-2609(86)80004-7
- [11] RHOUMA, Mohamed, Francis BEAUDRY, William THÉRIAULT a Ann LETELLIER. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7** [cit. 2020-11-03]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01789
- [12] DERIS, Zakuan Z., James D. SWARBRICK, Kade D. ROBERTS, et al. Probing the Penetration of Antimicrobial Polymyxin Lipopeptides into Gram-Negative

- Bacteria. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2014, **25**(4), 750-760 [cit. 2020-11-03]. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/bc500094d
- [13] YU, Zhiliang, Wangrong QIN, Jianxun LIN, Shisong FANG a Juanping QIU. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. *BioMed Research International* [online]. 2015, 1-11 [cit. 2020-11-05]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2015/679109
- [14] Antimicrobial resistance. WHO [online]. 2017 [cit. 2020-12-31]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/antimicrobial-resistance>
- [15] Antibiotika poslední záchrany selhávají: možná řešení této naléhavé hrozby pro pacienty a systémy zdravotní péče. In: *[Přehled politik ECDC]* [online]. Stockholm, 2016 [cit. 2020-12-31]. ISBN 978-92-9498-020-5. Dostupné z: doi:10.2900/80057
- [16] Evropský antibiotický den: Fakta pro odborníky. European Antibiotic Awareness Day [online]. [cit. 2020-12-31]. Dostupné z: <https://antibiotic.ecdc.europa.eu/cs/informujteseinformacni-listy/fakta-pro-odborniky>
- [17] BARON, Sophie, Linda HADJADJ, Jean-Marc ROLAIN a Abiola Olumuyiwa OLAITAN. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2016, **48**(6), 583-591 [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023
- [18] FALAGAS, Matthew E., Petros I. RAFAILIDIS a Dimitrios K. MATTHAIU. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates* [online]. 2010, 13(4-5), 132-138 [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: doi:10.1016/j.drug.2010.05.002
- [19] LY, Neang S., Jenny YANG, Jorgen B. BULITTA a Brian T. TSUJI. Impact of Two-Component Regulatory Systems PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB on Colistin Pharmacodynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2012, 56(6), 3453-3456 [cit. 2020-12-06]. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.06380-11
- [20] OLAITAN, Abiola O., Serge MORAND a Jean-Marc ROLAIN. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014, 5. ISSN 1664-302X [cit. 2020-12-12]. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2014.00643
- [21] LIU, Yi-Yun, Yang WANG, Timothy R WALSH, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2016, **16**(2), 161-168 [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- [22] SHEN, Zhangqi, Yang WANG, Yingbo SHEN, Jianzhong SHEN a Congming WU. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2016, **16**(3) [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(16)00061-X
- [23] XAVIER, Basil Britto, Christine LAMMENS, Rohit RUHAL, Samir KUMAR-SINGH, Patrick BUTAYE, Herman GOOSSENS a Surbhi MALHOTRA-KUMAR. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance* [online]. 2016, **21**(27) [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280

- [24] YIN, Wenjuan, Hui LI, Yingbo SHEN, et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *MBio* [online]. 2017, **8**(3) [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.00543-17
- [25] CARATTOLI, Alessandra, Laura VILLA, Claudia FEUDI, Ludovica CURCIO, Serenella ORSINI, Andrea LUPPI, Giovanni PEZZOTTI a Chiara Francesca MAGISTRALI. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* [online]. 2017, **22**(31) [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589
- [26] BOROWIAK, Maria, Jennie FISCHER, Jens A HAMMERL, Rene S HENDRIKSEN, Istvan SZABO a Burkhard MALORNY. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2017, **72**(12), 3317-3324 [cit. 2021-02-03]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkx327
- [27] ABUOUN, Manal, Emma J STUBBERFIELD, Nick A DUGGETT, et al. Mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2017, **72**(10), 2745-2749 [cit. 2020-02-03]. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkx286
- [28] YANG, Yong-Qiang, Yun-Xia LI, Chang-Wei LEI, An-Yun ZHANG a Hong-Ning WANG. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2018, **73**(7), 1791-1795 [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dky111
- [29] WANG, Xiaoming, Yao WANG, Ying ZHOU, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections* [online]. 2018, **7**(1), 1-9 [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: doi:10.1038/s41426-018-0124-z
- [30] CARROLL, Laura M., Ahmed GABALLA, Claudia GULDIMANN, Genevieve SULLIVAN, Lory O. HENDERSON, Martin WIEDMANN a Mark S. TURNER. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *MBio* [online]. 2019, **10**(3), e00853-19 [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.00853-19
- [31] WANG, Chengcheng, Yu FENG, Lina LIU, Li WEI, Mei KANG a Zhiyong ZONG. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerging Microbes & Infections* [online]. 2020, **9**(1), 508-516 [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: doi:10.1080/22221751.2020.1732231
- [32] LING, Zhuoren, Wenjuan YIN, Zhangqi SHEN, Yang WANG, Jianzhong SHEN a Timothy R WALSH. Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2020, **75**(11), 3087-3095 [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkaa205
- [33] ZABIDI, Mohd Shafie, Ruzilawati ABU BAKAR, Nurfadhlin MUSA a Wan Nazirah WAN YUSUF. Analytical methodologies for measuring colistin levels in pharmacokinetic studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2020, **43**(15-16), 671-686 [cit. 2020-10-05]. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2020.1783291

- [34] DOTSIKAS, Yannis, Catherine K. MARKOPOULOU, John E. KOUNDOURELLIS a Yannis L. LOUKAS. Validation of a novel LC-MS/MS method for the quantitation of colistin A and B in human plasma. *Journal of Separation Science* [online]. 2011, **34**(1), 37-45 [cit. 2020-10-05]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201000680
- [35] WAN, Eric Chun-hong, Clare HO, Della Wai-mei SIN a Yiu-chung WONG. Detection of residual bacitracin A, colistin A, and colistin B in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2006, **385**(1), 181-188 [cit. 2020-10-06]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-006-0325-5
- [36] GOBIN, P., F. LEMAITRE, S. MARCHAND, W. COUET a J. C. OLIVIER. Assay of Colistin and Colistin Methanesulfonate in Plasma and Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2010, **54**(5), 1941-1948 [cit. 2020-10-05]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.01367-09
- [37] FU, Qin, Xiaowei LI, Kangni ZHENG, Yuebin KE, Yingyu WANG, Lina WANG, Fugen YU a Xi XIA. Determination of colistin in animal tissues, egg, milk, and feed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2018, **248**, 166-172 [cit. 2020-10-10]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.12.029
- [38] XIA, Xi, Zheng WANG, Yulin FU, et al. Association of colistin residues and manure treatment with the abundance of mcr-1 gene in swine feedlots. *Environment International* [online]. 2019, **127**, 361-370 [cit. 2020-10-12]. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2019.03.061
- [39] SIN, Della Wai-mei, Clare HO, Yiu-chung WONG, Siu-kei HO a Alec Chun-bong IP. Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2005, **535**(1-2), 23-31 [cit. 2020-10-17]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2004.11.063
- [40] VAN DEN MEERSCHE, Tina, Els Van PAMEL, Christof Van POUCKE, Lieve HERMAN, Marc HEYNDRICKX, Geertrui RASSCHAERT a Els DAESELEIRE. Development, validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, **1429**(2016), 248-257 [cit. 2020-10-07]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2015.12.046
- [41] XU, Yingjiang, Xiuhui TIAN, Chuanbo REN, et al. Analysis of colistin A and B in fishery products by ultra performance liquid chromatography with positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2012, **899**, 14-20 [cit. 2020-11-02]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2012.04.028
- [42] TAO, Yanfei, Shuyu XIE, Yufei ZHU, et al. Analysis of Major Components of Bacitracin, Colistin and Virginiamycin in Feed Using Matrix Solid-phase Dispersion Extraction by Liquid Chromatography-electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2018, **56**(3), 285-291 [cit. 2020-10-09]. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmx096
- [43] SONG, Xuqin, Qiwen HUANG, Yingxia ZHANG, Meiyu ZHANG, Jingmeng XIE a Limin HE. Rapid multiresidue analysis of authorized/banned cyclopolypeptide antibiotics

- in feed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry based on dispersive solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2019, **170**, 234-242 [cit. 2020-11-01]. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2019.03.050
- [44] LI, Jian, Robert W. MILNE, Roger L. NATION, John D. TURNIDGE a Kingsley COULTHARD. Stability of Colistin and Colistin Methanesulfonate in Aqueous Media and Plasma as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2003, **47**(4), 1364-1370 [cit. 2021-01-26]. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.47.4.1364-1370.2003
- [45] MATAR, Kamal M. a Batool AL-REFAI. Quantification of Colistin in Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to a Pharmacokinetic Study. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-65041-w
- [46] ROBERT, Christelle, Pierre-Yves BRASSEUR, Michel DUBOIS, Philippe DELAHAUT a Nathalie GILLARD. Development and validation of rapid multiresidue and multi-class analysis for antibiotics and anthelmintics in feed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* [online]. 2016, **33**(8), [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: doi:10.1080/19440049.2016.1207808
- [47] RIEMENSCHNEIDER, C., W. ZERR, N. VATER, H. BRUNN, S.A.I. MOHRING a G. HAMSCHER. Analysis and behavior of colistin during anaerobic fermentation. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **170**, 303-309 [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2014.07.100
- [48] RASSCHAERT, Geertrui, Daan VAN ELST, Lander COLSON, et al. Antibiotic Residues and Antibiotic-Resistant Bacteria in Pig Slurry Used to Fertilize Agricultural Fields. *Antibiotics* [online]. 2020, **9**(1) [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9010034
- [49] BLACKWELL, P. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta* [online]. 2004, **64**(4), 1058-1064 [cit. 2021-4-24]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2004.05.006
- [50] DAVIS, Caroline A. a Elisabeth M.-L. JANSSEN. Environmental fate processes of antimicrobial peptides daptomycin, bacitracins, and polymyxins. *Environment International* [online]. 2020, **134** [cit. 2021-4-24]. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2019.105271
- [51] EMA (2016). Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health (EMA/CVMP/CHMP/231573/2016) [online]. [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en-0.pdf
- [52] EMA (2019). Categorisation of antibiotics in the European Union (EMA/CVMP/CHMP/682198/2017) [online]. [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf
- [53] ÚSKVBL (2019) Spotřeba antimikrobik ve veterinární medicíně v ČR: Detailní komentované srovnání spotřeb antimikrobik 2010-2017, p.1-39, www.uskvbl.cz

- [54] Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Colistin#section=Chemical-and-Physical-Properties>. [cit. 2021-4-25]
- [55] SONG, Xuqin, Jingmeng XIE, Meiyu ZHANG, Yingxia ZHANG, Jiufeng LI, Qiwen HUANG a Limin HE. Simultaneous determination of eight cyclopolypeptide antibiotics in feed by high performance liquid chromatography coupled with evaporation light scattering detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2018, 1076, 103-109 [cit. 2021-5-8]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2018.01.020
- [56] LEPORATI, Marta, Rosaria Ornella BUA, Filippo MARIANO, Paola CARIGNANO, Maurizio STELLA, Luigi BIANCONE a Marco VINCENTI. Determination by LC–MS/MS of Colistins A and B in Plasma and Ultrafiltrate From Critically Ill Patients Undergoing Continuous Venovenous Hemodiafiltration. *Therapeutic Drug Monitoring* [online]. 2014, **36**(2), 182-191 [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: doi:10.1097/FTD.0b013e3182a8997c
- [57] ZHAO, Miao, Xiao-Jie WU, Ya-Xin FAN, Bei-Ning GUO a Jing ZHANG. Development and validation of a UHPLC–MS/MS assay for colistin methanesulphonate (CMS) and colistin in human plasma and urine using weak-cation exchange solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2016, **124**, 303-308 [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2016.02.045
- [58] HEBERER, Thomas. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* [online]. 2002, **131**(1-2), 5-17 [cit. 2021-5-12]. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4274(02)00041-3
- [59] GUO, Ruizi, Xueyao DING, Xiaoxia ZHONG, Shangji GAO a Yongxue SUN. Molecular and ultrastructural insights into the earthworm *Eisenia fetida* of the assessment of ecotoxicity during colistin exposure. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2014, **21**(23), 13405-13411 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-014-3256-2
- [60] DAI, Chongshan, Jichang LI a Jian LI. New insight in colistin induced neurotoxicity with the mitochondrial dysfunction in mice central nervous tissues. *Experimental and Toxicologic Pathology* [online]. 2013, 65(6), 941-948 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: doi:10.1016/j.etp.2013.01.008
- [61] KARPÍŠKOVÁ, Renáta, Tereza GELBÍČKOVÁ, Alžběta KALOVÁ, Ludmila MRAVCOVÁ a Šárka POLÁKOVÁ. Antimikrobiální rezistence v půdě a případně dalších částech životního prostředí: Zpráva z funkčního úkolu MZe za rok 2020. Brno, listopad 2020.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

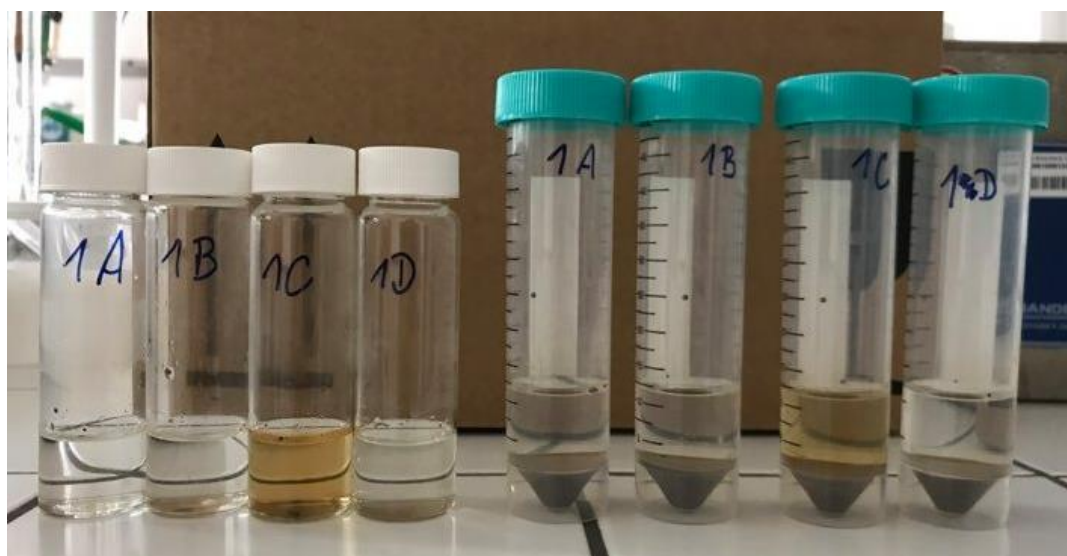
CS	kolistin sulfát
CMS	sodná sůl kolistimethátu
LPS	lipopolysacharid
NDH-2	enzym oxidoreduktáza
Kdo	kyselina ketodeoxyoktulózónové
L-Ara4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinoza
PEtN	fosfoetanolamin
CPS	kapsulární polysacharid
mcr	mobilized colistin resistance
NDARO	National Database of Antibiotic Resistant Organisms
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
PCU	Population Correction Unit
SPE	solid phase extraction (extrakce na pevnou fázi)
HLB	hydrophilic-lipophilic balance (hydrofilně-lipofilní sorbent)
WCX	weak cation exchange
SCX	strong cation exchange
MSPD	matrix solid phase dispersion
DSPE	disperzní extrakce na pevné fázi
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UPLC	ultra performance liquid chromatography
BEH	ethylene bridged hybrid
ESI	elektrosprej
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
MeOH	methanol
ACN	acetonitril
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
TCA	kyselina trichloroctová
HSP70	heat shock protein 70

8 PŘÍLOHY

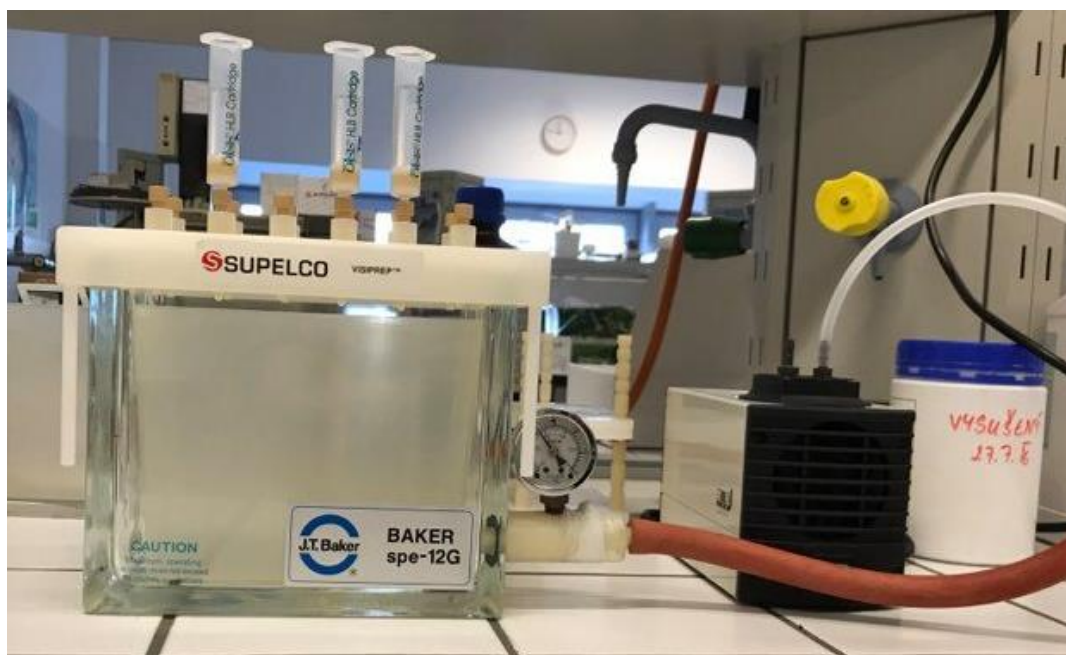
8.1 Extrakce



Obr 26: Extrakce v ultrazvukové lázni



Obr 27: Vzorky půdy a její extrakty po centrifugaci



Obr 28: Přečištění na kolonkách SPE



Obr 29: Sušení eluátů pod proudem dusíku